Aus der Abteilung Innere Medizin I
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. W. Dölle
der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen

Hemmwirkung von Cimetidin und Ranitidin auf die hepatischen fremdstoffabbauenden Enzyme des Menschen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
HEIKE HUTZEL
aus Stuttgart

1984

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536517_0037

Aus der Abteilung Innere Medizin I
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. W. Dölle
der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen

Hemmwirkung von Cimetidin und Ranitidin auf die hepatischen fremdstoffabbauenden Enzyme des Menschen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
HEIKE HUTZEL
aus Stuttgart

1984

Dekan: Professor Dr. H. D. Waller
1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. H. Hoensch
2. Berichterstatter: Professor Dr. W. Dölle

Druck: Zeeb-Druck, Tübingen 7 (Hagelloch)

Meinen Eltern gewidmet, als Dank für die nicht zuletzt auch wertvolle moralische Unterstützung während der Erstellung dieser Arbeit und während meines ganzen Studiums.

Inhaltsverzeichnis

		Seite
0.	Symbole, Abkürzungen	V
1.	E I N L E I T U N G	
1.1.	System der Biotransformation	1
1.2.	Faktoren zur Beeinflussung des Biotransformationssystems	8
1.2.1.	Biologische Faktoren	8
1.2.2.	Chemische Faktoren	9
1.2.2.1.	Induktion	9
1.2.2.2.	Hemmung	12
1.3.	Charakteristika von Cimetidin	15
1.4.	Charakteristika von Ranitidin	26
1.5.	Allgemeines über Enzyme und Enzymkinetik	29
1.6.	Hemmkinetik	36
1.6.1.	Kompetitive Hemmung	37
1.6.2.	Nichtkompetitive Hemmung	38
1.6.3.	Unkompetitive Hemmung	39
1.6.4.	Hemmung durch Substratüberschuß	39
1.6.5.	Allosterische Hemmung	40
1.6.6.	Inhibitionskonstante K_i	41
2.	M A T E R I A L I E N U N D M E T H O D I K	
2.1.	Materialien	43
2.1.1.	Leber	43
2.1.2.	Chemikalien und ihre Abkürzungen	44
2.1.3.	Geräte	46
2.2.	Methoden	46
2.2.1.	Präparation der Mikrosomen	46
2.2.2.	Bestimmung der Enzymaktivität der 7-Äthoxycoumarin-O-Deäthylase (EOD)	49
2.2.2.1.	Enzymtestaufbau	49
2.2.2.2.	Messung der Enzymaktivität	50
2.2.2.3.	Berechnung der Enzymaktivität	50

Seite

2.2.3. Bestimmung der Enzymaktivität der NADPH-Cytochrom c-Reduktase (kurz: Reduktase) 52
2.2.3.1. Enzymtestaufbau 52
2.2.3.2. Messung der Enzymaktivität 53
2.2.3.3. Berechnung der Enzymaktivität 54
2.2.4. Proteinbestimmung nach LOWRY (28) 55
2.2.5. Erstellung einer Enzym- und Hemmkinetik und ihre Fehlerquellen 56
2.2.6. Erstellung eines Bindungs- oder Differenzspektrums 61

3. V E R S U C H S E R G E B N I S S E
3.1. Zeitabhängigkeit der Enzymaktivität 65
3.2. Die O-Desalkylierungsrate von 7-Äthoxycoumarin mit Lebermikrosomen bei Ratten 66
3.3. Die O-Desalkylierungsrate von 7-Äthoxycoumarin mit Lebermikrosomen beim Menschen 67
3.4. Die Reduktionsrate von Cytochrom c mit Lebermikrosomen beim Menschen 70
3.5. Bindungsspektren von Cimetidin und Ranitidin 71
3.6. Abbildungen und Tabellen 71

4. D I S K U S S I O N 95

5. Z U S A M M E N F A S S U N G 110

6. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S 112

7. L E B E N S L A U F 125

0. Symbole, Abkürzungen (s. auch 2.1.2.)

ACh	Acetylcholin
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
Cyt P-450	Cytochrom P-450
EOD	7-Äthoxycoumarin-0-Deäthylase
MG	Molekulargewicht
M	Molar
mM	Millimolar = 10^{-3}M
µM	Mikromolar = 10^{-6}M
n	Normal
nM	Nanomal = 10^{-9}Mol
pM	Picomol = 10^{-12}Mol
Upm	Umdrehungen pro Minute
g'	Erdbeschleunigung
g	Gramm
mg	Milligramm = 10^{-3}
µg	Mikrogramm = 10^{-6}g
l	Liter
ml	Milliliter = 10^{-3}l
min	Minute
sec	Sekunde
IE	Internationale Einheit
Fe	Eisen
Prot	Protein
S	Substrat
E	freies Enzym
ES	Enzym-Substrat-Komplex
P	Produkt

1. E I N L E I T U N G

1.1. System der Biotransformation

Der Mensch ist in der heutigen Zeit mehr denn je der Technik und dem Fortschritt mit seinen guten, aber eben auch schlechten Folgen teilweise recht hilflos ausgeliefert. Das Schlagwort "Umweltschutz" spiegelt so das erwachte Bewußtsein nach Schutz seiner Umwelt und damit eben auch Schutz für sich vor einer sich fast zur Lawine entwickelnden Menge von Gefahren, die man in ihrer Tragweite noch immer nicht absehen kann.

Durch immer neuere und empfindlichere Nachweismethoden der modernen Wissenschaft ahnt man, wie weit die natürliche Umgebung des Menschen schon vergiftet ist, durch körperfremde Stoffe, auxh Xenobiotica genannt, die sich, seien sie fest, flüssig oder gasförmig, im Boden, Wasser und der Luft verteilen und langsam immer mehr anhäufen, und die eben auch vor dem Mensch nicht haltmachen, da dieser ahnungslos mit jedem Atemzug, mit seiner Nahrung und direkt mit der Haut alles aufnimmt und seinen Körper damit fertig werden läßt oder auch nicht.

So fanden sich nun in diesen Abgasen, den industriellen Produkten, die doch zum Teil zum Wohle der Menschheit entwickelt wurden, wie Herbizide, Insektizide, Dünger, die dann auf die Nahrung übergehen, oder in modernen Genußmitteln wie Alkohol und Rauchen, zahlreiche Krankheitsverursacher, sogar Mutagene, Karzinogene und Teratogene.

Nicht zuletzt auch die moderne Medizin kann mit therapeutisch verabreichten Arzneimitteln nicht nur die erwünschte Hauptwirkung, sondern auch schädliche Nebenwirkungen erzielen, einerseits durch den pharmakologischen Grundsatz: 'Keine Wirkung ohne Nebenwirkung', andererseits auch durch individuelle Besonderheiten des Patienten, woraus eine Überdosierung entstehen kann. Diese Giftstoffe können sich im menschlichen

Körper ansammeln und zusätzlich auch noch durch gegenseitige Beeinflussung, seien es mehrere Medikamente oder Umweltgifte mit Medikamenten, Schäden anrichten.

Ganz schutzlos ist der Körper diesen Xenobiotica jedoch nicht ausgeliefert. Er versucht die Stoffe so schnell wie möglich auszuscheiden. Hier ergibt sich jedoch die Schwierigkeit, daß diese Giftstoffe zum größten Teil lipophilen Charakter haben, also ausgezeichnet in den Körper eindringen können, durch die lipophilen Membranen des Körpers penetrieren bzw. sich dort anreichern, eventuell auch auf dem Blutwege in den Primärharn gelangen, dort aber bei der Konzentrierung leicht ihrem Konzentrationsgefälle folgend in das Gewebe und das Blut zurückdiffundieren. Der Körper besitzt ein enzymatisches System, das die Lipoidlöslichkeit der Stoffe vermindert und damit die Ausscheidbarkeit erhöht.

Dieses Biotransformationssystem ist recht unspezifisch, was den Vorteil hat, daß eine sehr heterogene Stoffklasse, wie sie die Xenobiotica darstellt, umgesetzt werden kann. Ebenso werden körpereigene Stoffe umgesetzt, teilweise auch zur besseren Ausscheidung mittels Glucuronidierung (Bsp. Bilirubin) oder um sie in ihre wirksame Form umzuwandeln, wie Steroidhydroxylation zu Hormonen (Bsp. Cortisol, Testosteron). Da nun körpereigene und körperfremde Stoffe mit den gleichen unspezifischen Enzymen umgesetzt werden, ergibt sich die Gefahr der gegenseitigen Beeinflussung. Zum Beispiel können lebenswichtige Wirkstoffe durch die Biotransformationsenzyme, die durch körperfremde Stoffe aktiviert werden können (s.u.), unter ihren physiologischen Spiegel sinken, was beim Vitamin D zur Osteomalazie führen kann. Da nun die Enzyme nicht unterscheiden können, ob ihre Substrate für den Organismus nützlich oder schädlich sind, so kann durch die Umsetzung ein Toxin zwar unschädlich gemacht werden (= Entgiftung), genauso aber durch Oxidation z.B. von aromatischen und aliphatischen Doppelbindungen toxische Epoxyde entstehen oder Methanol zum giftigen Formaldehyd oder zur Ameisensäure umgewandelt werden (= Giftung).

Medikamente können durch die Biotransformation an Wirkung verlieren (z.B. Barbiturate), oder der Metabolit ist wirksam wie bei Cyclophosphamid (Endoxan^{R}). So kann also der Biotransformation keine allgemeine Schutzfunktion im Sinne eines Entgiftungsmechanismus zugeschrieben werden.

Wo ist dieses Biotransformationssystem nun lokalisiert? Sinnvollerweise an einer lipophilen Stuktur, wo es gleich Kontakt hat mit den lipophilen Fremdstoffen, nämlich fest an lipoidhaltige Membranen gebunden. Brodie (10) entdeckte um 1958 als erster, daß die arzneimitteloxydierenden Enzyme an kanälchen- oder bläschenartigen Gebilden, von Membranen umschlossen, die die ganze Zelle als weitverzweigtes, schlauchförmiges Hohlraumsystem durchziehen, verbunden mit Kern und Zelloberfläche, nachweisbar sind. Dieses endoplasmatische Retikulum kann durch differentielles Zentrifugieren eines Zellhomogenats gewonnen werden, und wird dann von den Biochemikern 'Mikrosomen' genannt. Da das glatte endoplasmatische Retikulum (die Enzyme sind dort höher konzentriert als im rauhen ER) (62) in jeder Zelle des menschlichen Organismus vorkommt, müßte auch die Biotransformation überall vorkommen. Jedoch sind dafür einige Organe spezialisiert, wie z.B. die Leber, wo die höchste Aktivität von arzneimitteloxydierenden Enzymen nachgewiesen wurde, zumal diese für die Biotransformation besonders günstige Voraussetzungen hat: sie kommt primär in Kontakt mit den Stoffen des Darmes, gehört zu den am besten durchbluteten Geweben und besitzt ein lockeres Lückenendothel der Sinusoide und eine porenreiche Membran der Parenchymzellen: alles ermöglicht einen regen Stoffaustausch mit Fremd- oder körpereigenen Stoffen. Aber auch in anderen Organen, besonders an den inneren und äußeren Grenzflächen des Körpers wie Lunge, Dünndarm und Haut, aber auch Niere, Placenta, Nebenniere und Testis spielt die Biotransformation eine gewisse Rolle, in den beiden letzt genannten Organen vor allem zur Hormonsynthese (s.o.).

So kann nun der Fremdstoff oder das Medikament leicht über Darm, Lunge oder Haut in den Körper gelangen, durch die lipophilen Zellmembranen diffundieren und sich am Eintrittsort oder nach einer Blutpassage am glatten endoplasmatischen Retikulum (kurz: gER) festsetzen, wo es zwei großen Gruppen von Reaktionen unterworfen ist:

1. Strukturverändernde Reaktion oder Phase I- Reaktion:
   umfaßt Oxidation, Reduktion, Hydrolyse.
   Es wird die Struktur des Stoffes und meist auch die Wirkung verändert, indem funktionelle Gruppen eingeführt oder freigelegt werden, für:

2. Aufbauende Reaktion oder Phase II - Reaktion:
   umfaßt Konjugation mit Glucuronsäure, Schwefelsäure, Aminosäure oder Glutathion.
   Hier werden an die funktionellen Gruppen der Phase I Reste aus dem Intermediärstoffwechsel gekoppelt.
   So entstehen biologisch meist inaktive und wasserlösliche Produkte.

Der wichtigste biotransformatorische Weg wird in der Phase I durch die Monooxygenasen vorgenommen, die am gER näher zum Zytoplasma hin sitzen, und in der Phase II durch die Glucuronyltransferasen, die näher dem Lumen des gER lokalisiert sind, was auch den Weg der lipophilen Stoffe verdeutlicht, die aus der Zelle aufgenommen und in wasserlöslicher Form in das Lumen des gER abgegeben werden, von dort durch die Kanälchen an die Zelloberfläche in die Sinusoide und damit in die Blutbahn oder in die Gallenkapillare abgegeben werden. Weitere Enzyme der Phase I und II, die in den Zytosomen der Zelle wirken, sind die Dioxygenasen, bei denen beide Sauerstoffatome an das Substrat gebunden werden (besonders bei Bakterien); die Oxidasen, bei denen die Oxidation durch Wasserstoffentzug erfolgt (z.B. Alkoholdehydrogenase); weiter Reduktasen, Hydrolasen und Transferasen.

Die Oxidationsreaktion durch Monooxygenasen wird durch ein membrangebundenes Enzymsystem bewerkstelligt. Obwohl der Arzneimittelmetabolismus schon um 1850 beobachtet wurde, entdeckte man die Bedeutung der Biotransformation eben auch im Bezug auf Medikamente erst seit Mitte unseres Jahrhunderts. Zahlreiche Monographien und ganze Zeitschriftenserien beschäftigen sich mit diesem Problem, und so wurden auch die molekularen Grundlagen deutlicher. 1963 erkannten Estabrook, Cooper und Rosenthal im CYTOCHROM P-450, das von Klingenberg schon 1955 in Lebermikrosomen entdeckt wurde, das Schlüsselenzym der Monooxygenase - Reaktion. Ebenso beobachteten Axelrod und Brodie um die gleiche Zeit, daß auch reduziertes Nicotin-adenin-dinucleotid-phosphat (NADPH) und O_2 dazu benötigt wird.

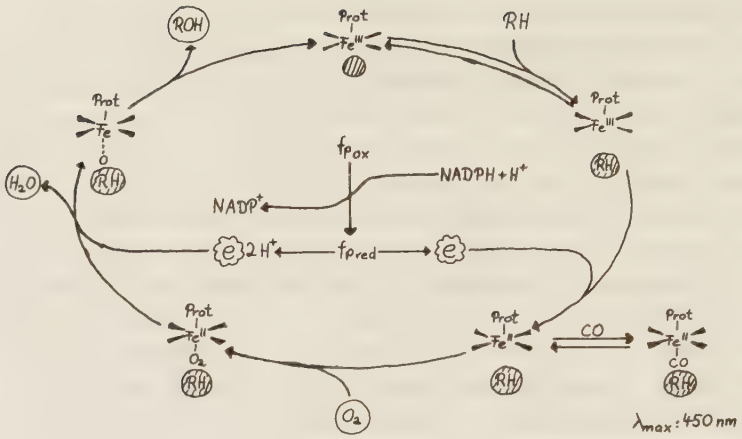
So ist das Enzym "Monooxygenase" nur in Kombination mit dem Häm-Enzym Cytochrom P-450 (kurz: Cyt P-450), dem Flavinenzym NADPH-Cytochrom P-450-Reduktase und einem Phospholipid, vor allem Phosphatidylcholin, aktiv und kann ein Substrat in Gegenwart von NADPH und O_2 umsetzen.

Bilanzgleichung der Monooxygenase-Reaktion: (62)

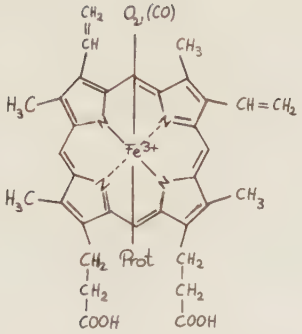
$$R\text{-}CH_3 + O_2 + NADPH + H^+ \xrightarrow[\text{Cyt P-450}]{\text{Reduktase}} R\text{-}CH_2\text{-}OH + NADP^+ + H_2O$$

In der Bilanz sieht die Reaktion also folgendermaßen aus: ein O-Atom wird in das Substrat eingebaut (Monooxygenase), das andere O-Atom wird zu H_2O reduziert. Wegen dieser doppelten Funktion nennt man die Monooxygenase auch mischfunktionelle Oxygenase.

Ein Schema soll den Kreisprozeß der Oxidation verdeutlichen:
(22) fp=Flavoprotein=NADPH-Cyt P-450-Reduktase
◍ = hydrophobe Bindungsstelle des Enzymproteins für das Substrat



Cyt P-450 gehört zur Klasse der b-Cytochrome und besitzt somit als prosthetische Gruppe ein Protohäm, das bedeutet ein zentrales Fe^{3+}-Atom in einem Porphinring mit 4 Methyl-, 2 Vinyl- und 2 Propionyl-Substituenten. (Häm hat zum Unterschied nur Fe^{2+}). Über das Fe^{3+} ist das 'Häm' nichtkovalent an ein Protein gebunden. Cyt P-450 und Cyt b_5 sind die einzigen Cytochrome, die in den Mikrosomen vorkommen, die anderen sind in den Mitochondrien für die Atmungskette lokalisiert. Cyt P-450 bindet also nun als Fe^{3+}-Protein das zu oxidierende Substrat an einem hydrophoben Bereich des Proteins. Die NADPH-Cyt P-450-Reduktase (auch NADPH-Cyt c-Reduktase genannt, als solche aber nur im isolierten Zustand) oxidiert nun das NADPH und liefert zuerst ein Elektron um das Fe^{3+} des Cyt in Fe^{2+} zu reduzieren. So kann dieses Fe^{2+} molekularen O_2 als 6. Liganden binden. Mit gleicher Affinität kann es stattdessen auch CO binden, mit dem typischen Absorptionsmaximum des Cytochrom-CO-Komplexes bei 450nm, was dem Enzym auch den Namen gab.



Cytochrom P-450:
im 1. Schritt, vor der O-aktivierten Form

Nun wird ein weiteres Reduktionsäquivalent übertragen, wahrscheinlich wieder durch die NADPH-Cyt P-450-Reduktase, wobei ein O-Atom in Form von H_2O frei wird. So ist das verbleibende O-Atom aktiviert (deshalb Cyt P-450 auch als O-aktivierendes Enzym) und wird auf das Substrat übertragen, das sich nun als oxidiertes Produkt ablöst und ein regeneriertes Cyt P-450 (Fe^{3+}) zurückläßt, worauf der Kreisprozeß erneut beginnen kann.

So können also die unterschiedlichsten Substrate oxidiert werden, wobei es immer zu einem Einbau von einem O-Atom kommt, eventuell dabei auch zur Abspaltung einer Gruppe.

Als Beispiele: (22)	Aromat. Hydroxylierung	R-H	→ R-OH
	Aliphat. Hydroxylierung	$R-CH_3$	→ $R-CH_2OH$
	N-Desalkylierung	$R-NH-CH_3$	→ $R-NH_2+CH_2O$
	O-Desalkylierung	$R-O-CH_3$	→ $R-OH+CH_2O$
	Desaminierung	$R-CH_2-NH_2$	→ $R-CHO+NH_3$

Weitere Monooxygenasen wurden inzwischen entdeckt, die andere Cytochrome enthalten, so z.B. Cyt P-448, und die eine größere Spezifität beim Substratumsatz zeigen. (22)

Dieses Biotransformationssystem hat sich im Laufe der Phylogenese bei den Lebewesen zum Teil unterschiedlich entwickelt, so daß es quantitative und qualitative Unterschiede zwischen den verschiedenen Arten gibt. Dies spiegelt sich beim Mensch schon in der Embryonalentwicklung wider, in der die Glucuronidierung erst mit der Geburt, andere Transferreaktionen wie Acetylierung und Sulfatbildung schon viel früher auftreten (22). So ergeben sich also Schwierigkeiten, die Ergebnisse von Versuchstieren besonders in vivo auf den Menschen zu übertragen. Es ist z.B. bekannt, daß die Rattenleber Pharmaka fünfmal schneller umsetzt als der Mensch. Doch nicht nur zwischen verschiedenen Arten, sondern auch innerhalb der einen Species Mensch, gibt es bedeutende individuelle Unterschiede. So kann man also nie sicher vorhersagen, auf welchem Weg und wie schnell der einzelne Mensch ein Medikament umsetzt, so daß die Dosierung immer individuell sein muß. Diese Unterschiede sind durch zahlreiche Faktoren bedingt, deren Einfluß aber immer auch vom jeweiligen Substrat abhängt (90).

1.2. Faktoren zur Beeinflussung des Biotransformationssystems

1.2.1. Biologische Faktoren

Dazu gehören genetische Faktoren wie auch Geschlechtsdifferenzen. (Besonders bei Versuchstieren, beim Mensch

auch bei Nicotin- und Aspirin- Elimination berichtet) (90). Das Alter spielt wohl auch eine Rolle; so sind die Enzyme bei der Geburt noch nicht voll entwickelt, ebenso können sie im Alter wieder abnehmen, wie das für den Desmethyldiazepam-Metabolismus beim älteren Mensch gezeigt wurde (35). Weiter können besondere physiologische Zustände wie Schwangerschaft, circadianer Rhythmus und pathologische Zustände wie Krankheiten, hormonelle Störungen, Einfluß auf das Enzymsystem nehmen. Durch einseitige Ernährung oder Diät kann ein Mangel an Baustoffen des Enzyms, wie Proteine, Lipide und Eisen auftreten.

1.2.2. Chemische Faktoren

Bei diesen Stoffen, die mit der Nahrung oder bei sonstigem Kontakt mit der Umwelt über Lunge, Darm und Haut aufgenommen werden, aber vor allem auch bei Medikamenten, wurden zwei Beeinflussungsmuster entdeckt:

1.2.2.1. Induktion

Darunter versteht man die reversible Stimulierbarkeit der Synthese von Biotransformationsenzymen durch bestimmte Stoffe, wobei die Induktion schon nach einmaliger Gabe des Stoffes, jedoch nur bis zu einer bestimmten Grenze auftreten kann.

Arzneimittel als Induktoren: Hypnotika (besonders Pheno- und Hexobarbital
(22)
Analgetika (Aminophenazon)
Antiepileptika (Phenytoin)
Psychopharmaka (Meprobamat)
Antirheumatika (Phenylbutazon)
Antihistaminika (Diphenhydramin)
orale Antidiabetika (Tolbutamid)
Antibiotika (Rifampicin)
Steroidhormone (Cortisol)

Insektizide: DDT

Genußmittel: Coffein (22)
Zigarettenrauchen (33)
Alkohol unter bestimmten Umständen (31)

Diese Liste läßt sich beliebig erweitern,und es kommen immer mehr Stoffe hinzu.

Remmer beschreibt dazu 1967 (62) exemplarisch mit Phenobarbital und Versuchstieren die morphologischen Veränderungen bei der Enzyminduktion:
Elektronenoptisch beobachtet man eine Vermehrung der Tubuli des gER, die Zelle wird voluminöser, und es kann bei einer länger anhaltenden Induktion z.B. zu einer echten Leberhypertrophie führen. Biochemisch findet man eine Vermehrung der Lipoide und Proteine im ER und zwar in den glatten Membranen des ER, wo ja der Hauptsitz der Biotransformationsenzyme liegt. Der quantitativ messbare Anstieg des Cyt P-450, der mit dem in vitro gemessenen Anstieg der Oxidationsgeschwindigkeit der Enzyme übereinstimmt, ist also der Beweis, daß es sich bei dieser Proteinvermehrung um eine echte Enzymvermehrung handelt. Zusätzlich kann bei längerer Induktion sogar der Proteinabbau vermindert werden.

Diese Medikamente induzieren zum einen die Enzyme ihres eigenen Abbaus, was zum Phänomen der Gewöhnung an ein Medikament führt, so daß also bei gleicher Dosierung die Plasmakonzentration des Medikamentes schneller abnimmt und damit eventuell auch seine Wirkung, daß man also die Dosis erhöhen muß, um die gleiche Wirkung zu erhalten. Da diese Abbauenzyme jedoch recht unspezifisch sind, werden auch andere Medikamente schneller abgebaut, was zur Kreuztoleranz führt. Allerdings werden Enzyme, die nicht mit dem Abbau von Fremdstoffen in Zusammenhang stehen, wie z.B. die Glukose-6-Phosphatase, nicht vermehrt (62), was darauf hinweist, daß die neugebildeten glatten Membranen des ER nur für den Fremdstoffmetabolismus spezialisiert sind.

Diese wechselseitige Beeinflussung von Medikamenten birgt Gefahren in sich, zumal sie bei einzelnen oft gar nicht bekannt ist, oder die gleichzeitig eingenommenen "Medikamente" und Alkoholkonsum zum Teil nicht bekannt sind. Ein Beispiel ist der scheinbare Wirkungsverlust von Antikoagulantien des Cumarin-Typs bei gleichzeitiger Gabe von Phenobarbital, was zu erneutem Anstieg der Gerinnung führt, bei Dosiserhöhung jedoch die Gefahr von Blutungen ergibt, wenn Phenobarbital abgesetzt wird. Hier gibt es zahlreiche Beispiele, so wurde auch bei Epileptikerbehandlung mit Phenytoin die Abnahme der Wirksamkeit von oralen Kontrazeptiva beobachtet, eben weil diese schneller abgebaut werden. Remmer (62) meint jedoch, daß nur höhere Dosen des Induktors oder ihre Kummulation über längere Zeit eine Wechselwirkung machen können. Wie bereits oben beschrieben, können auch Plasmaspiegel von körpereigenen Wirkstoffen unter den Normalwert abfallen, wie bei Vit D, was zur Osteomalazie führen kann, oder beim Cortisol, das hydroxyliert in erhöhtem Maße ausgeschieden wird.

Man versucht nun jedoch in bestimmten Fällen diese wechselseitige Beeinflussung der Medikamente therapeutisch zu nützen, um z.B. bei einer kongenital nicht hämolytischen Gelbsucht das Bilirubin mittels Phenobarbital schneller ausscheidbar zu machen. Remmer beschreibt die Induktion nicht als Schädigung der Leberzelle, sondern als "besondere Art der Adaptation an unphysiologische Stoffe" (62), so daß man versucht, diesen physiologischen Weg mit Induktoren auch gegen unphysiologische Kanzerogene einzusetzen, die manchmal selbst Induktoren sind (Benzpyren, Methylcholanthren), und die dann durch stärkere Metabolisierung den Körper schneller wieder verlassen.

Eine andere Form der Induktion ist in vitro mit Triton X 100,und ähnlichen Detergentien beobachtet worden, das die Aktivität der Glucuronyltransferase steigert. Dies kann man sich dadurch erklären, daß das Detergenz die Membranen des gER strukturell verändert, und so das aktive Zentrum der Enzyme leichter mit dem Substrat reagieren kann.

1.2.2.2. Hemmung

Nicht weniger wichtig als die Induktion ist die Hemmung von arzneimittelmetabolisierenden Enzymen durch Medikamente wie Chloramphenicol (61), Disulfiram, Dicoumarol, Metyrapon, Propoxyphen und andere Umweltstoffe wie das Insektizid Parathion, die damit eine Verstärkung von Wirkungen und Nebenwirkungen anderer Medikamente bewirken.
Die Hemmung kann wie die Induktion auf dem Niveau der Proteinsynthese eingreifen, so sind Äthionin, Puromycin und Actinomycin D ganz unspezifische Proteinsynthesehemmer. Man spricht hier von Repression.
Es kann auch der Proteinabbau gesteigert werden.

Weiter kann spezifisch das Häm in seiner Synthese gehemmt oder im Abbau gefördert werden, wie durch Aminotriazol und Kobaltchlorid, was die Menge an Cyt P-450 herabsetzt. Cyt P-450 kann durch Substanzen auch direkt zerstört werden, wie durch die Lipidperoxidation bei CCl_4 oder durch Allyl- und C=S- Gruppen, wie z.B. das Insektizid Parathion, welches über das S-Atom das Enzym inaktiviert. Auch können Substanzen mit hohem Oxidations-Reduktions-Potential, wie z.B. Cytochrom c oder Methylenblau, Elektronen der Cyt P-450-Reduktase abfangen und damit die Monooxygenasereation unmöglich machen (90).

Am häufigsten ist wohl die eigentliche Inhibition, bei der z.B. zwei Medikamente oder ihre entstehenden Metabolite um die gleiche Bindungsstelle am abbauenden Enzym konkurrieren, sei es eine unspezifische Bindung des Medikaments an das Enzym oder eine Bindung, um selbst metabolisiert zu werden. Die Folge ist, daß eine oder beide Komponenten langsamer eliminiert werden, wie z.B. der Alkohol den Abbau anderer Medikamente bzw. seinen eigenen Abbau hemmen kann. So kann der Umsatz am Cyt P-450 durch Verdrängung an der Substratbindungsstelle oder an der O_2-Bindungsstelle, dem Eisen-Atom, beeinflußt werden. (s. später: Hemmtypen).

Wie gefährlich die oftmals nicht erkannte Wechselwirkung von Medikamenten werden kann, zeigen die Todesfälle, die mit Propoxyphen, einem synthetischen Opiat, das als sicher und ungiftig galt, besonders im Zusammenhang mit anderen Medikamenten gehäuft auftraten. Peterson et al (56) fanden die Ursache darin, daß sie Propoxyphen als Hemmstoff mikrosomaler Monooxygenasen in Mäuseleber identifizierten, etwas schwächer als sein chemischer Verwandter SKF 525A, dem Prototyp eines Hemmstoffs bei Tierversuchen. Die erhöhte Todesrate von Propoxyphen erklärte sich nun durch die erhöhte Anwendungsquote auch über längere Zeit, z.B. bei Heroinsüchtigen und Patienten, die auch sonst Medikamente insbesondere Alkohol und Barbiturate zu sich nahmen und eventuell schon einen Leberschaden hatten. Dadurch wurden die vorher relativ sicheren Propoxyphendosen in Verbindung mit anderen Medikamenten zu tödlichen Dosen, da ihre abbauenden Enzyme und damit ihre Elimination gehemmt werden.

Die Hemmung wurde auch schon therapeutisch angewendet, indem Disulfiram die Aldehyddehydrogenase hemmt und durch die so entstehende Alkoholintoleranz beim Alkoholentzug eingesetzt wurde. Metyrapon hemmt unter anderem die 11-ß-Hydroxylase der Nebennierenrinde, die für die Produktion von Aldosteron und Corticosteroiden verantwortlich ist, und kann deshalb bei Krankheiten wie Hyperaldosteronismus und M. Cushing eingesetzt werden. Besonders als diagnostischer Test zur Überprüfung der Funktionseinheit Hypothalamus-Hypophyse-Nebennierenrinde hat sich Metyrapon bewährt. Beim Gesunden wird durch Metyrapon der Cortisol- und Aldosteronspiegel des peripheren Blutes gesenkt, und damit steigt reaktiv der ACTH-Spiegel.

Man hofft auch, solche Hemmstoffe gegen chemisch induzierten Krebs einzusetzen (5), da man meint, daß sogar die Mehrzahl der Karzinogene durch die Biotransformation erst aktiviert werden (30). Weiterhin könnte man die Verlängerung von Halbwertszeiten und damit die Steigerung

der Wirksamkeit von Medikamenten therapeutisch ausnützen. Allerdingsbegrenzt der doch unspezifische Charakter der Hemmstoffe ihren therapeutischen Nutzen.
Nicht immer kann man ein Medikament oder einen sonstigen Fremdstoff eindeutig der Induktion oder Hemmung zuordnen; so wirken z.B. Propoxyphen, als auch SKF 525A, bei akuter Gabe als Inhibitoren, bei chronischer Gabe dagegen als Induktoren ihres eigenen Metabolismus. Genauso zeigt auch Alkohol beide Wirkungen unter verschiedenen individuellen Bedingungen (s.o. u. 31). So ist es bei jedem neu einzuführenden Medikament unerläßlich, eine etwaige Wechselwirkung mit anderen Medikamenten zu erforschen, um die vorher beschriebenen Mechanismen zu erkennen.

Die vorliegende Arbeit soll nun bei zwei Histamin H_2-Rezeptor-Antagonisten, Cimetidin (Tagamet^R, Smith Kline Dauelsberg Göttingen) und Ranitidin (Glaxo Group Research Limited, Ware, Hertfordshire, U.K.; noch nicht im Handel) die Wirkung auf menschliche Leberbiotransformationsenzyme in vitro testen.

Die Histamin H_2-Rezeptoren wurden pharmakologisch definiert, indem die klassischen H_1-Antihistaminika zwar die allergischen Wirkungen des Histamins an Haut, Bronchien und Gefäßen bzw. Kontraktionen an glatter Muskulatur wie Uterus, Darm und Bronchien unterdrücken, nicht aber die Wirkungen des Histamins am Magen zur Steigerung der Magensäure- und Pepsinsekretion und die positiv chronotrope Wirkung am Herzen bzw. die Beteiligung an der Blutdrucksenkung unterdrücken können (22). So werden also bei Magen, Herz und Kreislauf H_2-Rezeptoren postuliert, die nur durch spezifische H_2-Antihistaminika geblockt werden können.

Der molekulare Wirkungsmechanismus des Histamins am Magen ist noch nicht geklärt, da die Magensäuresekretion durch die drei Parameter N. Vagus in der kephal-vagalen Phase, Gastrin in der gastralen Phase und schließlich Histamin

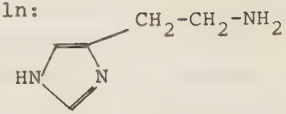
reguliert wird. Diese drei Parameter beeinflussen sich gegenseitig, hinzu kommt noch die Wirkung der Katecholamine, die durch das Histamin freigesetzt werden. Die Theorien dazu bewegen sich zwischen den Extremen einer 3- bzw. sogar 4-Rezeptoren Theorie, mit ACh-, H_2-, Gastrin- und eventuell sogar ß-adrenergen Rezeptoren an der Belegzelle des Magens, und einer finalen Chemostimulator-Theorie, wobei Histamin der einzige Stimulator an der Belegzelle ist und durch Gastrin, ACh (N.Vagus), auch durch Insulin beim Menschen, freigesetzt wird (14).

Ebenso ist noch nicht geklärt, ob Histamin überhaupt eine physiologische oder nur eine pharmakologische bzw. pathophysiologische Wirkung hat (14). Die H_2-Rezeptorenblocker hemmen nun spezifisch die H_2-Rezeptoren an der Belegzelle, wie am isolierten Meerschweinchenvorhof und am Ratten-Uterus, die beide nur H_2-Rezeptoren besitzen. Cimitidin (8,9) und Ranitidin (15) hemmen also kompetitiv die Vorhofskontraktion bzw. die Uterusrelaxation.

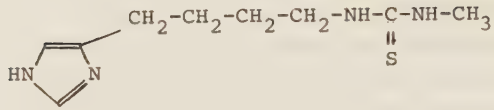
1.3. Charakteristika von Cimetidin

Die ersten H_2-Rezeptorenblocker, die entwickelt wurden, waren Burimamid und Metiamid. Die chemische Verwandtschaft mit Histamin in bezug auf den Imidazolring könnte die selektive Wirkung auf Histamin-Rezeptoren erklären (s. Formel). Allerdings zeigten sich in der klinischen Anwendung von Metiamid, das die Magensäuresekretion deutlicher als Burimamid hemmte, als ernste Nebenwirkungen Knochenmarksdepression mit Agranulocytose und Nierenschäden bei Tieren (8). Man sah den toxischen Effekt in der Thioharnstoffgruppe C=S und entwickelte daraufhin einen Thioharnstoffreien H_2-Rezeptorblocker mit einer Cyanoguanidino-Gruppe anstelle des Thioharnstoffs und behielt den Imidazolring als wohl wirksame Gruppe bei: das Cimetidin. Gravierende Nebenwirkungen wurden keine beschrieben (8).

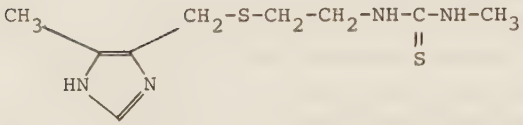
Formeln:



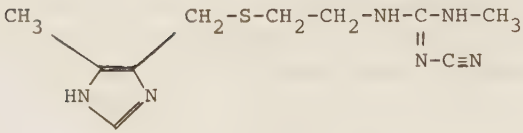
Histamin



Burimamid



Metiamid



Cimetidin =

N"-cyano-N-methyl-N'-(2-(5-methyl-imidazol-4-yl)methyl-thioethyl)guanidine

Cimetidin tritt seit 1976 einen Siegeszug in der Medizin im Kampf gegen Hypersekretionszustände des Magens an. Der Durchbruch kam sofort mit der Wirkung beim Duodenalulcus, dem klassischen Krankheitsbild bei Hypersekretion und Hyperchlorhydrie des Magens. Hier sorgt Cimetidin für eine schnelle und anhaltende Schmerzlinderung (im Mittel nach 13d) (43), die so charakteristisch ist, daß man sogar umgekehrt sagen kann, daß, wenn Cimetidin bei einem starken Oberbauchschmerz keine Schmerzlinderung bringt, auch kein Duodenalulcus vorliegt. Natürlich darf Cimetidin nicht zu einem diagnostischen Kriterium werden, sondern das Duodenalulcus muß endoskopisch bewiesen sein, um nicht andere Krankheiten wie Krebs oder Retikulose des Magens, deren Schmerz eventuell auch durch Cimetidin gelindert wird, zu übersehen (41).

Auch besteht die Gefahr, daß Patienten mit rezidivierenden Duodenalgeschwüren die Tabletten horten und bei jedem wiederkehrenden Symptom sich selbst verordnen und damit jede Diagnose erschweren.

Doch Cimetidin nimmt nicht nur den Schmerz, sondern steigert effektiv die Heilungsrate des Duodenalgeschwürs, so daß es bei 60% - 90% der Patienten innerhalb eines Monats abgeheilt ist. Peter et al zeigten in einer multizentrischen Studie eine mittlere Heilungsrate von 79% mit Cimetidin im Vergleich zu 58% Heilungsrate mit Placebo, beides innerhalb von 4 Wochen (14). Die Halbzeit der Geschwürsheilung wird von 20 Tage auf 6 Tage verkürzt (17). So sprich ein Editorial im Lancet (41) von Cimetidin als "the most popular of the ulcer-healing drugs", obwohl man auch jetzt laut Peter nicht ohne herkömmliche Medikamente zusätzlich, wie Antazida, auskommt (14).

Das große Problem bei der Ulcus-Therapie auch mit Cimetidin bleibt die Rezidivgefahr, die nach Absetzen der Cimetidin-Behandlung bei 70%-90% innerhalb von Wochen oder einigen Monaten auftritt (41). Hierüber gibt es zahlreiche Untersuchungen, ob nun die intermittierende Cimetidin Gabe bei neu auftretenden Ulcera oder eine Langzeittherapie mit Cimetidin z.B. bis 1 Jahr die besseren Ergebnisse bringt (13,14). So scheint sich doch bei einer Erhaltungsdosis des Cimetidins mit einer einzigen nächtlichen Dosis von 400 mg über 1 Jahr die Rezidivrate zumindest während der Behandlung stark zu verringern, wenn auch nach Absetzen der Dauertherapie schnell wieder Rezidive auftreten. Die Ulcus - Krankheit wird durch Cimetidin also nicht geheilt.

Zahllose Veröffentlichungen und ganze Symposien (Göttingen 1977, Westminster 1978) befassen sich nur mit Cimetidin und seiner Anwendung. Seine Wirkung auf die Magensäuresekretion wurde in zahlreichen Versuchen bei Mensch und Tier in vivo bestätigt.

Cimetidin hemmt die basale, nächtliche und nahrungsstimulierte, ebenso wie die Pentagastrin- und Histamin-stimulierte Magensäuresekretion (8, 13, 14, 17, 53). Diese Wirkung beruht also auf der Hemmung der H_2-Rezeptoren (s.o.), und zwar eindeutig kompetitiv bei Histaminstimulierter Magensäuresekretion, da die Cimetidin-Hemmung bei steigenden Histamin-Dosen abnimmt (14). Jedoch wird die Cimetidin-Hemmung bei Pentagastrin-Dosiserhöhung nicht vermindert, so daß hier wohl kein kompetitiver Mechanismus vorliegt. Dies widerspricht dann aber der Theorie, daß Gastrin durch Histamin-Freisetzung die Magensäuresekretion stimuliert. Ebenso zeigt sich die cholinerg stimulierte Sekretion allgemein resistenter gegenüber der Hemmung durch H_2-Rezeptorenblocker, so daß auch hier der N. Vagus wohl nicht nur über Histamin auf die Belegzellen einwirkt (14).

Im Gegensatz zu Antazida erhöht Cimetidin den pH-Wert des Magensaftes nicht über 2, so daß von daher kein Rebound-Effekt der Magensäureproduktion, besonders nach Absetzen des Präparates zu erwarten wäre (22). Doch darüber ist auch noch nicht das letzte Wort gesprochen, obwohl auch Arnold und Creutzfeldt (14) keine Gastrinspiegelerhöhung oder Belegzellhyperplasie nach der Cimetidin Therapie beim Menschen feststellen konnten, was Ausdruck eines Rebound-Effektes wäre und die Rezidivgefahr nach Absetzen von Cimetidin erklären könnte.
Auch die durch Histamin oder Pentagastrin stimulierte Pepsinsekretion wird durch Cimetidin gehemmt, jedoch nicht so regelmäßig und schwächer als die Säuresekretion (14).
Die Produktion des 'Intrinsic Factor' von der Belegzelle, stimuliert durch Pentagastrin, wird jedoch von Cimetidin nicht gehemmt, so daß es dadurch zu keinem Vitamin B 12-Mangelzustand kommen sollte (14).

Die gute Wirksamkeit von Cimetidin beim Duodenalulcus veranlaßte seine Anwendung auch bei anderen Indikationen, wo Hypersekretionszustände des Magens eine Rolle spielen. So beim Ulcus ventriculi, das mit Cimetidin zwar ebenfalls eine gute Heilungstendenz erkennen läßt, (69% Heilungsrate mit Cimetidin gegenüber 37% mit Placebo innerhalb von 4 Wochen) (14), allerdings ist hier die Schmerzlinderung geringer als beim Ulcus duodeni.Weiterhin recht gute Ergebnisse scheint Cimetidin bei der Therapie des Zollinger-Ellison-Syndroms und der Refluxösophagitis zu bringen. Vorsichtiger Optimismus ist ebenfalls bei der Prophylaxe akuter gastroduodenaler Läsionen, wie z.B. Streßulcera bei Risikopatienten (z.B. nach schwerer Operation), wie bei der Behandlung akuter Blutungen aus dem oberen Gastrointestinaltrakt mit Cimetidin angebracht. Bei letzteren wirkt Cimetidin eventuell über Verringerung des sauren Milieus für proteolytische Hormone, die damit inaktiviert werden und die sich bildenden Thromben auf der Blutung nicht mehr auflösen.

Im Gegensatz zu Forth-Henschler (22) sieht Kuschinsky (40) jedoch Cimetidin nicht geeignet bei der Therapie einer einfachen hyperaziden Gastritis. Damit wären wir bei den Nebenwirkungen. Diese Frage wird umso wichtiger, je mehr erwogen wird, Cimetidin als Langzeittherapie im Kampf gegen die Ulcuskrankheit einzuführen. Brimblecombe (8) beschreibt keine gravierenden Nebenwirkungen, und Lancet (41) bezeichnet Cimetidin bei Kurzzeitbehandlung als sicheres Medikament. Bei Einnahme von therapeutischen Dosen von Cimetidin mit maximal 2g/d kann es bei ca. 1% der Patienten zu leichten und reversiblen Störungen kommen, wie Durchfälle, Muskelschmerzen, Kopfschmerzen, Müdigkeit, Schwindel, Hautausschlag (14). Weiter wurde bei wenigen Patienten von einer Erhöhung der Serum-Transaminasen und der Plasma-Kreatinin-Werte berichtet. Ein antiandrogener Effekt entsteht durch kompetitive Verdrängung des Testosterons von seinen Rezeptoren, und durch einen Dopamin-antagonistischen Effekt kann die Prolactinfreisetzung stimuliert werden und so zur

Gynäkomastie führen. Über das Ausmaß und damit die klinische Bedeutung dieser Effekte gibt es unterschiedliche Ansichten. Burland (14) und Löffler (44) sehen sie als selten an, wogegen Simon (72) darin doch eine klinische Bedeutung sieht. Bei sehr hohen toxischen Dosen starben Hunde mit klonischen Krämpfen, was die Möglichkeit der Penetration von Cimetidin in das ZNS aufzeigt (8), was wiederum bei sehr alten und schwerkranken Patienten die reversiblen Verwirrtheitszustände erklären könnte. Immunologische Veränderungen mit Suppression von T-Lymphocyten treten nur nach sehr hohen Dosen bei Versuchstieren auf. Insgesamt dürften diese Veränderungen "kaum eine Einschränkung der klinischen Anwendung von Cimetidin erforderlich machen" (14).

In letzter Zeit wurden jedoch Wechselwirkungen von Cimetidin mit Medikamenten beschrieben, die auf alle Fälle von klinischer Wichtigkeit sind, und deren Parameter während einer Cimetidin-Therapie genauestens überwacht werden müssen. So beschrieben Serlin et al (70) eine Wechselwirkung von Cimetidin mit oralen Antikoagulantien vom Cumarin-Typ beim Menschen. Diese Medikamente wie Warfarin hemmen aufgrund ihrer Strukturähnlichkeit mit Vit K die Produktion von Vit K-abhängigen Gerinnungsfaktoren in der Leber, also Faktor II, VII,IX und X. Dadurch wird die Blutgerinnung herabgesetzt, was sich im Anstieg der Prothrombinzeit = Thromboplastinzeit = Quickabfall bemerkbar macht, da dieser Test drei Faktoren des Extrinsic Systems, II, VII und X, erfaßt. Cimetidin erhöht nun die Prothrombinzeit in seiner therapeutischen Dosis von 1g/d bei voll antikoagulierten Patienten, deren Prothrombinzeit schon von 15 sec auf 28,5 sec verlängert ist, im Mittel um weitere 12,6 sec auf 41,1 sec. Das bedeutet praktisch, daß Cimetidin die Warfarin Wirkung verdoppelt, was von großer klinischer Bedeutung ist. Gleichzeitig kann man messen, daß auch die Plasma-Warfarin-Konzentration nahezu verdoppelt ist, mit einem gleichzeitig signifikanten Abfall der Warfarin-Clearance aus dem Blut, den man schon bei einer einzigen Warfarin-Dosis bei zweiwöchiger Cimetidinbehandlung feststellen kann. Gleichzeitig

fallen die Gerinnungsfaktoren II, VII, IX und X, aber nicht V (da Vit K unabhängig), unter der Therapie mit Cimetidin weiter ab, was der erhöhten Warfarin-Konzentration und damit -Wirkung entspricht. Die Plasmaproteinbindung des Warfarins wird jedoch nicht verändert. Alle Parameter kehren unter Absetzen von Cimetidin auf ihren ursprünglichen Wert zurück. Dies alles deutet daraufhin, daß Cimetidin den Warfarinmetabolismus hemmt, also seine Eliminations-Halbwertszeit verlängert.

Das gleiche kann für den Antipyrin-Metabolismus gezeigt werden (27, 37, 59, 70). Eine nicht signifikante Tendenz zur Minderung des Verteilungsvolumens von Warfarin, nicht aber bei Antipyrin, könnte ebenso eine, aber weniger wahrscheinliche Erklärungsmöglichkeit darstellen.
Hetzel et al (28) zeigen an einem Fall, daß der Anstieg der Prothrombinzeit und damit die Hemmung des Warfarin-Metabolismus von der Cimetidin-Dosis abhängt und sprechen von einer 40%-50%-Steigerung der Prothrombinzeit mit 800-1000mg Cimetidin und einer nur 10%-Steigerung bei 400mg Cimetidin. Daraus ist ersichtlich, daß man antikoagulierte Patienten bei einer Cimetidin-Therapie gut überwachen muß und eventuell die Antikoagulans-Dosis erniedrigen, damit es zu keinen gefährlichen Blutungen kommt.

Bei der Gruppe der Benzodiazepine hat Klotz ebenfalls eine Wechselwirkung mit Cimetidin beim Menschen festgestellt. Schon nach einer einzelnen Tagesdosis von 1g Cimetidin wird die Eliminationshalbwertszeit einer einzelnen Diazepam-i.v.-Dosis von 0,1 mg/kg KG von 29,7 h auf 51,1 h im Mittel erhöht, ebenso die Plasma-Clearance um 43% vermindert (36). Die Plasmakonzentration von Diazepam wird also um mehr als 1/3 erhöht. Dadurch wird auch die Wirkung des Diazepams verstärkt, was sich darin zeigt, daß keine der 6 Versuchspersonen mit der Diazepam-Dosis allein, wohl aber 5 von 6 Versuchspersonen mit Diazepam + Cimetidin einschlafen (37). Auch bei Diazepam verändert sich das

Verteilungsvolumen, das wohl auf einer durch Cimetidin geänderten Gewebeperfusion bzw. -bindung beruht, da sich die Plasmaproteinbindung nicht ändert. Wie Diazepam verhält sich auch sein ebenfalls biologisch aktiver Metabolit Desmethyldiazepam, der allein schon eine längere Halbwertszeit von 51,7 h hat, die durch Cimetidin aber noch auf 72,6 h verlängert wird. Entsprechend fällt die Plasmaclearance ab; hier wird aber das Verteilungsvolumen wie die Plasmaproteinbindung nicht verändert (38). Die Sedierung durch eine orale Dosis von 20 mg Desmethyldiazepam wird durch Cimetidin von 12 auf 24 h verlängert. Das bedeutet also eine gewaltige Einschränkung der sonst relativ großen Sicherheitsbreite der Benzodiazepine, die bei so langen Halbwertszeiten bei multiplen Dosen leicht kumulieren.

Alle bisher besprochenen Medikamente, also Warfarin, Antipyrin, Diazepam und Desmethyldiazepam werden in der Leber zum größten Teil entweder hydroxyliert oder oxidiert bzw. demethyliert, um dann glucuronidiert leichter über die Niere ausgeschieden werden zu können.
Im Gegensatz dazu wird Oxazepam, ebenfalls ein Metabolit von Diazepam, nur noch glucuronidiert, da es im Vergleich zu Diazepam schon demethyliert und hydroxyliert ist, also keiner Phase I-Reaktion der Biotransformation mehr unterliegt (s.o.). Hier ist interessant festzustellen, daß die sowieso schon relativ geringe Halbwertszeit von Oxazepam von 12 h durch Cimetidin nicht verlängert wird, ebenso alle anderen Parameter von Oxazepam durch Cimetidin nicht beeinflußt werden (38). Das läßt darauf schließen, daß Cimetidin direkt in die Phase I-Reaktion der Biotransformation eingreift, dort den Metabolismus von Medikamenten hemmt, die Cyt P-450-unabhängige Phase II-Reaktion dagegen unberührt läßt. Genauso zeigen zahlreiche andere Veröffentlichungen, daß z.B. Chlordiazepoxid (Librium^{R}), das noch eine Methylgruppe enthält, durch Cimetidin beeinflußt wird, nicht aber Lorazepam, das im Vergleich zu Oxazepam nur ein Cl-Atom mehr trägt, sonst aber auch schon demethyliert und hydroxyliert ist. Diese Feststellung ist wohl von großer klinischer

Bedeutung, da Benzodiazepine sehr häufig mit Cimetidin bei peptischen Geschwüren gegeben werden, und Oxazepam einen großen Vorteil gegenüber den anderen hat.

Da nun Cimetidin wohl in das recht unspezifische Biotransformationssystem eingreift, ist anzunehmen, daß der Metabolismus von zahlreichen anderen endogenen und exogenen Stoffen geändert, vornehmlich gehemmt wird. So wird beim Menschen auch die Demethylierung des Aminopyrins (Aminophenazon = Pyramidon^{R}) gehemmt, welche dadurch gemessen wird, daß die Menge von radioaktivem $^{14}CO_2$ in der Atemluft nach i.v.-Injektion von radioaktivem ^{14}C-Aminopyrin unter Cimetidin-Therapie abnimmt (27). Dieser Versuch wurde auch bei Ratten gemacht mit Bestimmung der Plasmakonzentration von ^{14}C-Aminopyrin, die unter Cimetidin signifikant anstieg (58). Speeg (74) machte diesen Aminopyrinatmungstest bei Ratten mit einzelner und chronischer Gabe von Cimetidin und fand dabei, daß innerhalb von 30 Tagen keine Gewöhnung an die Hemmung des ^{14}C-Aminopyrin-Metabolismus durch Cimetidin eintritt, und daß schon einen Tag nach Absetzen von Cimetidin nahezu ursprüngliche Plasmaeliminationshalbwertszeiten von ^{14}C-Aminopyrin erreicht werden. Ebenso verlängerte sich bei Ratten die Schlafdauer nach intraperitonealer Hexobarbitalgabe mit vorheriger Cimetidinbehandlung (58). Dieser Effekt wurde allerdings von Brimblecombe (8) beiMäusen nicht beobachtet.

Um die komplexen Einflußmöglichkeiten auf Medikamente in vivo zu umgehen, wurde das Cyt P-450-abhängige Monooxygenase-System der Leber speziell in vitro getestet. Dazu dienten bei Ratten die präparierten Mikrosomen (58), bzw. beim Mensch das Homogenat von Leberbiopsiematerial (59), das also die unspezifischen Enzyme des Arzneimittelmetabolismus enthält, denen man Modellsubstrate mit den zugehörigen Co-Faktoren anbietet, deren gemessene Metabolitkonzentration

dann ein Maß für den stattgefunden "Arzneimittel"-Metabolismus darstellt. So zeigte Puurunen (58) und Speeg (74) bei Ratten, daß die Aminopyrin-N-Demethylation, wie die Benzpyrenhydroxylation sowohl bei Ratten (58) als auch beim Menschen (59) in vitro durch Cimetidin gehemmt wird, ebenso beim Menschen die Coumarinhydroxylation und die O-Dealkylierung von 7-Äthoxycoumarin (59).

Ein weiteres Indiz dafür, daß Cimetidin auf der Ebene der Biotransformationsenzyme in den Arzneimittelmetabolismus eingreift, ist die Arbeit von Wilkinson (87), in der er 1- und 4(5)- substituierte Imidazole (zu letzteren gehört Cimetidin, siehe Formel) als eine der stärksten mikrosomalen Enzyminhibitoren bezeichnet, die je beschrieben wurden. Im Gegensatz zu Imidazol allein und 2-substituierten Imidazolen haben die 1- und 4(5)-substituierten Imidazole eine große Hemmwirkung auf die mikrosomale Epoxidation und Hydroxylation von Ratten, weniger auf die N-Demethylation.

An Bindungsstudien (s. später) konnte gezeigt werden, daß der starke Hemmeffekt der substituierten Imidazole mit niedrigen Spektral-Dissoziationskonstanten (K_s) einhergeht, was eine starke Bindung an die Mikrosomen ausdrückt. Aus obiger Feststellung (Cimetidin hemmt nur Cyt P-450-abhängige Phase I-Reaktionen) kann man schließen, daß die substituierten Imidazole sich stark an das Cyt P-450 binden. Die oben beschriebene Notwendigkeit von Substituenten spricht dafür, daß damit der lipophile Charakter des sonst polaren Moleküls (bei Cimetidin, 8) erhöht und eine hydrophobe Bindung in der Nähe der aktiven Seite ermöglicht wird, was eine Beeinflussung der Substratbindung nach sich zieht. So sagt Wilkinson (87), daß die Bindungskapazität der Imidazole hauptverantwortlich für ihren Hemmeffekt sei.

Cimetidin bindet allerdings recht unspezifisch an das Cyt P-450, da es selbst nur zu 10%-20% durch die mikrosomalen Leberenzyme metabolisiert wird. Es wird nach oraler Gabe gut

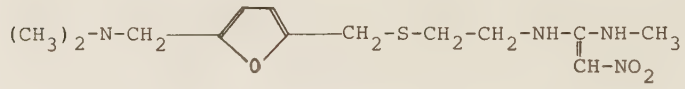
im Duodenum oder Ileum resorbiert und verteilt sich in alle Gewebe, wird daraus aber rasch wieder eliminiert, nur in Leber, Niere und Nebennierenrinde wird es konzentriert. In der Leber wird es dann auch zu 10%-20% metabolisiert, vor allem an seinem S-Atom oxidiert, was zum Sulphoxid als Hauptmetabolit führt. Ebenso finden Hydroxylationen an der Methyl-Gruppe statt. Diese werden dann ebenso im Harn ausgeschieden, wie die restlichen 70% unverändert im Harn erscheinen (8, 12, 14). Es ist noch nicht geklärt, ob auch diese Metabolite zur Hemmwirkung des Cimetidins beitragen (37, 38), wenn auch Speeg (74) bei Ratten zeigt, daß der Hauptmetabolit Cimetidinsulphoxid in vivo keine Veränderung des Aminopyrinatmungstestes macht, jedoch in vitro eine schwache Hemmung der Aminopyrin-N-Demethylation bewirkt, allerdings schwächer als Cimetidin selbst.

Die Konzentrierung von Cimetidin in der Leber, bei der 5fach höhere Cimetidin-Konzentrationen in der Galle als im peripheren Blut festgestellt wurden (38), ist ein weiteres Wirkprinzip der Hemmstoffe. So beschreibt auch Peterson (56), daß die eigentliche Blutkonzentration von sogenannten "Hemmstoffen" in therapeutischer Dosis gar nicht ausreichen würde, um die in vitro gezeigte Hemmung zu veranlassen. Allein die Konzentrierung der Hemmstoffe in der Leber (für Propoxyphen ungefähr 30fach) (56) bewirkt dann, daß die eigentliche Wirkkonzentration an den Leberenzymen die K_i-Werte der Hemmstoffe (s. später) erreicht und damit auch in vivo zu einer Hemmung führt. So läßt sich auch die Tatsache erklären, daß schon nach einem Tag Vorbehandlung mit Cimetidin z.B. bei Antipyrin schon die maximale Plasmahalbwertszeit erreicht wird, die durch eine weitere Behandlung mit Cimetidin nicht, wie eventuell erwartet, zu steigern ist. So wird Cimetidin wohl länger an die Leberenzyme gebunden, als das nach einer Plasmahalbwertszeit von 2 h zu erwarten wäre (38).

1.4. Charakteristika von Ranitidin

Mit der Beschreibung dieser Nebenwirkung von Cimetidin wurde Anfang 1979 dieser neue spezifische H_2-Rezeptor-antagonist mit substituierter Amino-alkyl-furan-Struktur entdeckt. Überraschenderweise hat er nicht den Imidazolring wie Histamin und Cimetidin, der als die eigentliche Wirkgruppe zur Blockierung der Histamin H_2-Rezeptoren angesehen war. Dieser zentrale Imidazolring ist durch einen Furanring ersetzt, und die Seitenkette ist verändert.

Formel:



Ranitidin=

N-(2-(((5-(dimethylaminomethyl)-2-furanyl)methyl)thio)-ethyl)-N'-methyl-2-nitro-1,1-ethenediamine

Der H_2-Rezeptor-Antagonismus wurde wie bei Cimetidin am isolierten Meerschweinchenvorhof und Rattenuterus getestet (15). Ranitidin zeigt ebenfalls einen kompetitiven Antagonismus, wobei die benötigte Konzentration, um die Hälfte der Rezeptoren zu besetzen, mit 1×10^{-7}M etwas niedriger liegt, als bei Cimetidin mit 8×10^{-7}M (8), was auf eine höhere Effektivität hindeutet.

Ebenso wird die Pentagastrin stimulierte Magensäuresekretion beim Menschen durch Ranitidin 4mal stärker gehemmt als mit der gleichen Dosis Cimetidin (17). Die nächtliche Säuresekretion wird von 80 mg Ranitidin um 95% gehemmt, dagegen von 400mg Cimetidin um 66%. Auch die Dauer der Hemmung der basalen Säuresekretion ist bei Ranitidin viel länger: mit 150 mg kann eine 50%-Hemmung über 8 h aufrechterhalten werden (53, 72, 84). Die nächtliche Pepsinsekretion hemmt

Ranitidin auch, jedoch nicht so stark, wobei morgens eine überschießende Hypersekretion stattfindet, im Gegensatz zur morgendlichen Säuresekretion (53).

Da nun Ranitidin die Säuresekretion stärker und länger hemmt als Cimetidin, ist die Frage, ob es auch in der Behandlung des Duodenalulcus so gute Erfolge wie Cimetidin aufweist. Es zeigt sich, daß die Dosen von 200 mg Ranitidin/Tag bzw. 1 g Cimetidin/Tag praktisch die gleiche Heilungsrate innerhalb von 4 Wochen aufweisen (85). Die Angaben schwanken zwischen 80% und 90%. Ebenso ist die Zeit bis zur Schmerzfreiheit bei diesen Dosen gleich (43).

Da nun die klinische Wirksamkeit von Ranitidin (sogar in 1/5 der Dosis) mit Cimetidin gut übereinstimmt, wird die Wahl zwischen beiden Medikamenten mehr durch die Neigung zu Nebenwirkungen entschieden. Dadurch läßt sich auch klären, ob die Nebenwirkungen, die mit Cimetidin beobachtet wurden, auf die Hemmung der H_2-Rezeptoren zurückzuführen sind; dann müßte auch Ranitidin die gleichen Nebenwirkungen zeigen; oder ob sie für Cimetidin molekülspezifisch sind. So werden die leichten Erhöhungen des Serum-Harnstoffs und Serum-Kreatinins im Gegensatz zu Cimetidin bei Ranitidin nicht beobachtet, ebenso weist Ranitidin in therapeutischen Dosen keinen antiandrogenen Effekt und keine stimulierte Prolactinfreisetzung auf (73). Verwirrtheitszustände treten bei älteren Patienten nicht auf, was auch damit erklärt werden kann, daß Ranitidin im Gegensatz zu Cimetidin eine geringere Liquorgängigkeit aufweist. Bei Ranitidin ist ein Plasma-Liquor-Verhältnis von 20:1, bei Cimetidin von 4:1 beschrieben (72). Auch hier ist jedoch unwahrscheinlich, daß die Nebenwirkungen von Cimetidin durch die H_2-Rezeptorblockade und nicht aufgrund eines unspezifischen Moleküleffekts zustande kommen.

So kommt es nun vor allem auch darauf an, die Wechselwirkung von Ranitidin mit anderen Medikamenten zu untersuchen,

das sich bei Cimetidin ja als entscheidender Punkt herausstellte. Dazu gibt es nun noch nicht sehr viele Veröffentlichungen. Henry (27) und Staiger (76) haben beim Menschen in vivo bereits gezeigt, daß Ranitidin in therapeutischen Dosen von 200-300mg/d im Gegensatz zu Cimetidin den Antipyrin-Metabolismus nicht beeinflußt, da die Antipyrin-Halbwertszeit und die Antipyrin-Clearance mit den Werten vor der Ranitidin-Therapie übereinstimmten. Ebenso wird die Halbwertszeit des ausgeatmeten $^{14}CO_2$ beim Aminopyrinatmungstest mit Ranitidin nicht verlängert, wieder im Gegensatz zu Cimetidin (s.o.). Die Autoren ziehen daraus auch hier den Schluß, daß die mikrosomale Enzyminhibition bei Cimetidin nicht von der Eigenschaft der H_2-Rezeptorblockade abhängt, da diese ja auch Ranitidin aufweist, sondern von der chemischen Struktur von Cimetidin abhängt. Speeg et al (74) zeigten dagegen bei der Ratte in vitro, daß Ranitidin hier auch einen Hemmeffekt auf die Aminopyrin-N-Demethylation ausübt, jedoch einen geringeren als Cimetidin.

Man weiß nun also noch nicht, wie Ranitidin mit den Biotransformationsenzymen der Leber reagiert. Man weiß, daß es nach oraler Gabe zu 50%-80% bioverfügbar ist, und die Wirkung sehr lang anhält, obwohl die Eliminationshalbwertszeit mit 2-2 1/2 h der von Cimetidin entspricht. Ranitidin wird zu 50% unverändert im Urin ausgeschieden, sonst in der Leber selbst metabolisiert, wobei in 2%-4% ein aktiver Metabolit Desmethyl-Ranitidin und drei inaktive Metabolite nachgewiesen wurden (72). Die Metabolisierung bedeutet, daß sich Ranitidin an irgendeine Struktur der Biotransformationsenzyme bindet und dabei wie Cimetidin auch eine Hemmung auslösen könnte.

Die vorliegende Arbeit soll nun in vitro an menschlichem Lebermaterial mit Hilfe spezieller Enzymtests, die die Monooxygenasereaktionen des Arzneimittelmetabolismus in der Leber widerspiegeln, zeigen, ob Ranitidin im Vergleich zu Cimetidin im Hinblick auf eine Hemmung dieser arzneimittelmetabolisierenden Enzyme einen Vorteil aufweist.

Jedoch vor der Beschreibung meines Vorgehens bei diesen Enzymtests soll noch auf die besonderen Eigenschaften von Enzymen und die verschiedenen Arten ihrer Hemmung, soweit sie sich an Enzymkinetiken darstellen lassen, eingegangen werden (3, 11, 57).

1.5. Allgemeines über Enzyme und Enzymkinetik

Die Enzyme oder auch Fermente sind makromolekulare Proteine mit einem Molekulargewicht von 10^4-10^6. Sie übernehmen die Rolle von Biokatalysatoren im Stoffwechsel der lebenden Zelle, sind also die "Arbeiter in der Fabrik Zelle" (47). Damit Stoffwechselreaktionen bei Körpertemperatur überhaupt ablaufen können, ist vielfach Aktivierungsenergie nötig. Diese Reaktionsträgheit wird mit Hilfe von Enzymen herabgesetzt, indem sie die benötigte Aktivierungsenergie vermindern und dadurch die Reaktionsgeschwindigkeit zur Gleichgewichtseinstellung in beiden Richtungen erhöhen, ohne jedoch die Gleichgewichtslage zu verändern, weder beim Fließgleichgewicht oder steady state im offenen System, also in der lebenden Zelle (= in vivo), wo sich ein echtes Gleichgewicht durch die ständige Entfernung der Reaktionsprodukte in Reaktionsketten sowieso nicht einstellt, und die Reaktionen immer unidirektional verlaufen; noch beim echten chemischen Gleichgewicht im geschlossenen System, also im Reagenzglas (= in vitro), wo Enzyme auch im extrahierten Zustand genauso biologisch aktiv sind. Die Bedeutung der Enzyme liegt weiterhin in der Regulation von Stoffwechselvorgängen, deren Reaktionsgeschwindigkeit durch Variation zum einen der Menge des Enzyms durch Induktion oder Repression, zum anderen der Aktivität des Enzyms durch Aktivierung oder Inhibition verändert wird.

Der Mechanismus der Enzymkatalyse ist folgender:
Das Enzymmolekül besitzt ein oder mehrere aktive Zentren, die entweder Teil des Proteinmoleküls selbst sind oder sich als Nicht-Protein, dem Co-Enzym, mit dem Apoenzym, dem

allein nicht wirksamen Enzymprotein, zum aktiven Holoenzym verbinden. Dieses aktive Zentrum ist für die Wirkung des Enzyms verantwortlich, indem sich das umzusetzende Substrat (S) daran bindet und in diesem sehr reaktionsfähigen aber kurzlebigen Enzym-Substrat-Komplex (ES) aktiviert ist. Zur Auslösung der Reaktion und damit zur Umwandlung in das eigentliche Produkt bedarf es nur noch einer Ladungs- bzw. Elektronenverschiebung, wobei neben dem Produkt (P) das Enzym (E) unverändert frei wird. Diese Wechselwirkung Enzym - Substrat ist meist recht spezifisch, allein schon aus sterischen Gründen, daß eben nur ein bestimmtes Substratmolekül bzw. eine bestimmte Art von Bindung (z.B. Peptidbindung) wie ein Schlüssel zum Schloß des aktiven Zentrums paßt und auch hier nur auf eine ganz bestimmte Art (z.B. hydrolytische Spaltung des Petids) umgesetzt werden kann.

Die Enzymkinetik beschäftigt sich nun mit dem zeitlichen Ablauf der enzymkatalysierten Reaktion, die sich dann etwas vereinfacht folgendermaßen darstellen läßt:

$$E + S \underset{k_{+2}}{\overset{k_{+1}}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{k_{+3}} E + P$$

Symbole: E = freies Enzym; S = Substrat;
ES = Enzym-Substrat-Komplex; P = Produkt
E_{ges} = E + ES = Gesamtmenge des Enzyms

k_{+1}, k_{+2}, k_{+3} sind hierbei die Geschwindigkeitskonstanten, wobei die eigentliche Reaktionsgeschwindigkeit der Gesamtreaktion nur durch k_{+3} charakterisiert ist, da dieser Schritt langsamer ist als $E + S \rightleftharpoons ES$ und daher geschwindigkeitsbestimmend. Die Rückreaktion von $E + P \longrightarrow ES$ kann man vernachlässigen, da als Reaktionsgeschwindigkeit nur die Initialgeschwindigkeit gemessen wird, wobei P = O ist.

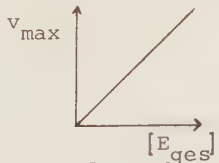
Die Geschwindigkeit einer chemischen Reaktion ist definiert durch die Änderung der Konzentration des Substrats oder des Produkts in der Zeiteinheit. Daraus folgt hier für die Reaktionsgeschwindigkeit:

$$v = \frac{d[P]}{dt} = k_{+3} \cdot [ES]$$

Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit wird erreicht, wenn [ES] den höchsten Wert annimmt, das bedeutet, wenn alles Enzym als ES - Komplex vorliegt, also E≪ES. Jetzt liegt Substratsättigung vor, d.h., daß eine weitere Substratzugabe die Reaktionsgeschwindigkeit nicht erhöhen kann, da kein freies Enzym mehr zur Reaktion zur Verfügung steht.

$\longrightarrow$ bei Substratsättigung: $v_{max} = k_{+3} \cdot [E_{ges}]$

= 1) v abhängig von der Enzymkonzentration



2) v abhängig von der Substratkonzentration:

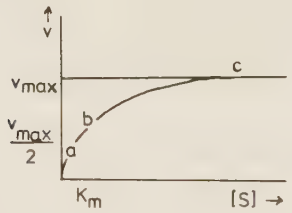
Bei steigender Substratkonzentration nimmt die Reaktionsgeschwindigkeit bis zu einem Maximum zu:

c: v_{max} bei Substratsättigung (s.1). v_{max} ist nur von $[E_{ges}]$ abhängig

a: $[ES] < [E]$. v ist gering, da ES gering. v ist hier vor allem von S abhängig.

b: Dieser Punkt wurde fiktiv gewählt, um v_{max} als wichtige Kenngröße für Enzyme bestimmen zu können.

Da die Substratkonzentration bei v_{max} nur schwer von der Kurve ablesbar ist, führte man die Michaelis-Konstante K_m als diejenige Substratkonzentration ein, bei der $v_{max}/2$ erreicht ist, das Enzym also zur Hälfte mit Substrat abgesättigt ist, und freies Enzym und ES-Komplex in gleicher Konzentration vorliegen. $[E] = [ES]$. K_m hat die Dimension [Mol/Liter] und liegt für viele Enzyme in der Größenordnung 10^{-3} bis 10^{-6} Mol/l.



Rechnerisch erhält man K_m unter der Voraussetzung des Fließgleichgewichtes oder steady states, das die längste Phase der Reaktion ausmacht, und die man bei enzymkinetischen Messungen bestrebt ist, zu erfassen. Hier bleibt die Konzentration des freien Enzyms wie die des Enzym-Substrat-Komplexes konstant. Ebenso nimmt das Produkt linear mit der Zeit zu, sowie das Substrat linear mit der Zeit ab.

Voraussetzung ist weiterhin ein möglichst großes Verhältnis S : E, da dann der konstante S-Umsatz und damit das steady state über viele Minuten hin aufrechterhalten werden kann (3). Nur dann ist es auch erlaubt, in die Michaelis-Menten-Gleichung für [S] nicht die Konzentration des freien Substrats, sondern die zugesetzte Substratkonzentration einzusetzen, da der Anteil des gebundenen Substrats ES sehr gering ist gegenüber dem freien Substrat S (3). Das Enzym reicht auch in geringer Menge aus, da ein Enzymmolekül eine Vielzahl von Substratmolekülen umsetzen kann.

Experimentell ist daher zu beacnten.

1. eine möglichst geringe Enzymmenge einzusetzen, was an die Empfindlichkeit der Nachweismethoden höhere Anforderungen stellt.

2. Weiterhin muß man versuchen, die Initialgeschwindigkeit der Reaktion zu erfassen, damit die Rückreaktion E + P $\longrightarrow$ ES unberücksichtigt bleiben kann, (s.o.) und man davon ausgehen kann, daß sich die Substratkonzentration während der Messung nur gering verändert hat.

3. Der Bereich des steady state läßt sich an der Linearität der Umsatz-Zeit-Kurve (= Abhängigkeit zunehmender Produktkonzentration von der Zeit) kontrollieren.

Unter obigen Voraussetzungen kann man also Bildungs- und Zerfallsgeschwindigkeit des ES-Komplexes gleichsetzen

$$\longrightarrow k_{+1} \cdot [E]\,[S] = k_{+2} \cdot [ES] + k_{+3} \cdot [ES]$$

mit $E = E_{ges} - ES$

$$\longrightarrow \quad \frac{([E_{ges}] - [ES])[S]}{[ES]} = \frac{k_{+2} + k_{+3}}{k_{+1}} = K_m$$

nach dem Massenwirkungsgesetz

mit $v = k_{+3} \cdot [ES]$ und $v_{max} = k_{+3} \cdot [E_{ges}]$

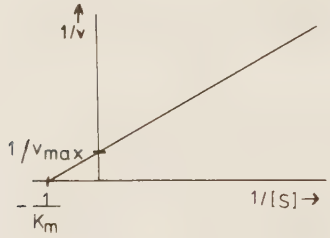
$$\longrightarrow \quad v = \frac{v_{max} \cdot [S]}{K_m + [S]} = \underline{\text{Michaelis-Menten-Gleichung}}$$

Als reziproker Ausdruck

$$1/v = \frac{K_m}{v_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{max}}$$

stellt diese Gleichung den mathematischen Ausdruck für eine Gerade in der Form y = ax + b dar, die sich graphisch im Lineweaver-Burk-Diagramm ergibt, in dem 1/v gegen 1/S aufgetragen wird.

Hier ergibt sich nun die leichtere graphische Ermittlung von K_m als Schnittpunkt mit der Abszisse und von v_{max} als Schnittpunkt mit der Ordinate.



Lineweaver-Burk-Diagramm

Die Michaelis-Konstante und die maximale Reaktionsgeschwindigkeit sind nun die zwei Kenngrößen, mit denen ein Enzym mit seinem jeweiligen Substrat eindeutig charakterisiert ist.

K_m hat folgende praktische Bedeutung:

- "Sie ist unabhängig von der Enzymkonzentration"

- "Sie ermöglicht eine Berechnung derjenigen Substratkonzentration, die zum Erreichen maximaler Reaktionsgeschwindigkeit notwendig ist". (ca. 100 K_m)

- "Sie ist entscheidend für die Beurteilung der Wirkungsweise von Enzymhemmern".

- "Sie ist ein Maß für die Affinität des Enzyms zum Substrat" (11), insofern sich K_m nur durch k_{+3} von der eigentlichen Dissoziationskonstanten

$$k_s = \frac{k_{+2}}{k_{+1}}$$ des ES-Komplexes unterscheidet, und k_{+3}

bei der meist langsameren Reaktion sehr klein und damit vernachlässigbar ist. Es gilt: K_m groß = Affinität E-S klein.

Das experimentelle Vorgehen zur Charakterisierung eines Enzyms besteht nun darin, unter Berücksichtigung vorher geschildeter Voraussetzungen, mit einer kleinen Menge Enzym und einer bestimmten Menge Substrat eine Umsatz-Zeit-Kurve der Reaktion zu erstellen, also [P] in Abhängigkeit von t aufzutragen, und im linearen Anfangsbereich die Steigung der Geraden als Reaktionsgeschwindigkeit

$v = \frac{dP}{dt}$ zu bestimmen, und diese in Abhängigkeit von der Substratkonzentration reziprok in ein Lineweaver-Burk-Diagramm einzutragen und daraus K_m und v_{max} zu bestimmen.

3) v abhängig von der Temperatur:

Weiter ist noch zu beachten, daß die Reaktionsgeschwindigkeit von der Temperatur abhängig ist, da das Enzym als Protein ein bestimmtes Temperaturoptimum hat. Anfangs steigt die Reaktionsgeschwindigkeit mit zunehmender Temperatur durch Zunahme der kinetischen Energie der reagierenden Moleküle, bis ab einem gewissen Punkt das Enzym als thermolabiles Protein denaturiert und damit desaktiviert wird.

4) v abhängig vom pH-Wert:

Die Enzyme besitzen ebenso ein pH-Optimum, jenseits dessen das Protein zum einen säuredenaturiert wird oder zum anderen elektrische Ladungen von E und S für die Bindung negativ beeinflußt werden.

Wir haben bisher die Reaktionsgeschwindigkeit als charakteristisch für das Wirken eines Enzyms bezeichnet, nämlich wieviel Produkt pro Zeiteinheit entsteht, bzw. wieviel Substrat pro Zeiteinheit umgesetzt wird.

Genauso ist auch die Aktivität eines Enzymes definiert, als diejenige Enzymmenge, die 1 uMol Substrat/min unter Standardbedingungen (z.B. Temp. 25°C, pH-Optimum und Substratsättigung) katalysiert, was also v_{max} entspricht.
Als spezifische Aktivität eines Enzyms bezieht man sich auf die Menge Enzymproteins in mg.
Bei meinen Versuchen gebe ich die spezifische Aktivität des Enzyms in pM oder nM Produkt/min/mg Protein an.

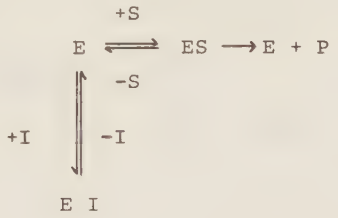
1.6. Hemmkinetik

Mit Hilfe von optimal erstellten Enzymkinetiken kann man nun auch über Wirkungsweise und Angriffsort von Enzyminhibitoren Aussagen machen, sofern es sich um spezifische, reversible Hemmungen handelt. Unspezifische Hemmungen eines Enzyms können durch vielerlei Faktoren, die die Umgebung des Enzyms verändern und damit das aktive Zentrum beeinflussen, bedingt sein. So können fast alle Stoffe in einer genügend hohen Konzentration die Enzymreaktion beeinflussen. Enzymkinetisch kann man jedoch nur bei spezifischen Hemmungen folgende Hemmtypen unterscheiden:

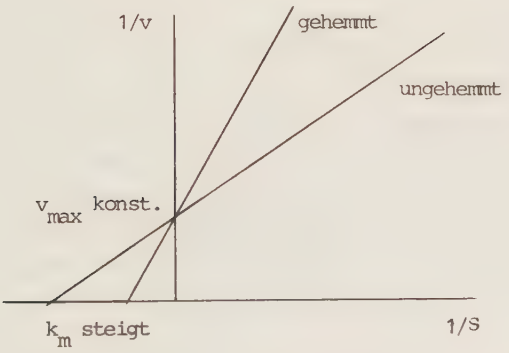
1.6.1. Kompetitive Hemmung:

Hier weisen Substrat und Inhibitor meist eine ähnliche Struktur auf und konkurrieren dann reversibel um das aktive Zentrum des Enzyms. Dadurch nimmt die Affinität zwischen Enzym und Substrat ab (= K_m steigt), man braucht höhere Substratkonzentrationen, um die maximale Reaktionsgeschwindigkeit zu erreichen, die aber konstant bleibt. (=v_{max} konstant). Das relative Ausmaß der Hemmung hängt vom Konzentrationsverhältnis Inhibitor/Substrat ab. Ein Beispiel dafür ist die Hemmung eines Enzyms durch sein eigenes Produkt, um einen Produktüberschuß zu verhindern.

Als Formel:



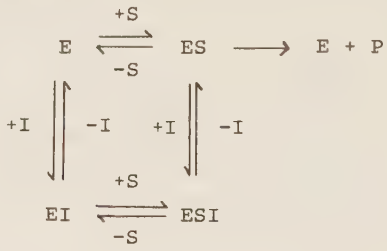
Graphisch dargestellt:



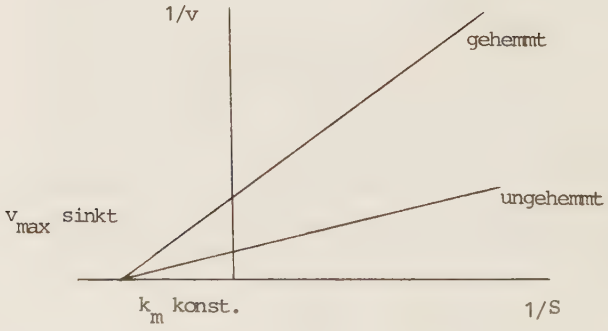
1.6.2. Nichtkompetitive Hemmung:

Der Inhibitor lagert sich hier reversibel außerhalb des aktiven Zentrums an das Enzym oder den ES-Komplex an. Dabei wird die Affinität Substrat zu Enzym nicht beeinflußt (=K_m konstant), jedoch die Bildung oder der Zerfall des ES-Komplexes behindert und damit die Reaktionsgeschwindigkeit herabgesetzt (=v_{max} sinkt).
Das relative Ausmaß der Hemmung ist bei allen Substratkonzentrationen gleich. Ein Beispiel gibt es bei Mehrsubstratreaktionen, wo es mehrere aktive Zentren gibt, und sich der Hemmstoff gegenüber einem Substrat kompetitiv, zum anderen nichtkompetitiv verhält.

Als Formel:



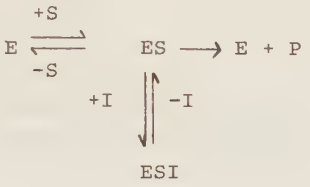
Graphisch dargestellt:



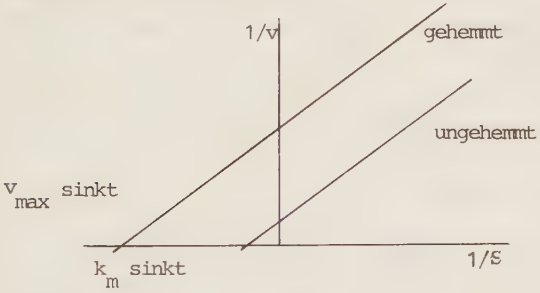
1.6.3. Unkompetitive Hemmung:

Seltener kommt dieser Hemmtyp bei Einsubstratreaktionen vor, bei dem der Inhibitor nur mit dem ES-Komplex reagiert und dabei die maximale Reaktionsgeschwindigkeit vermindert ($=v_{max}$ sinkt), jedoch die Affinität Enzym-Substrat erhöht ($=K_m$ sinkt), so daß K_m/v_{max} konstant bleibt.

Als Formel:



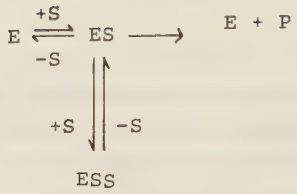
Graphisch dargestellt:



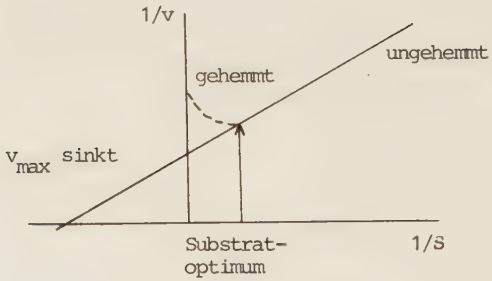
1.6.4. Hemmung durch Substratüberschuß:

Bei hoher Substratkonzentration kann es auch zur Bildung von inaktivem ESS-Komplex kommen, der um so häufiger wird, je größer der Substratüberschuß ist. Im Lineweaver-Burk-Diagramm ergibt sich eine charakteristische Glockenkurve mit einem Substratoptimum.

Als Formel:



Graphisch dargestellt:



1.6.5. Allosterische Hemmung:

Diese weitaus komplexere Hemmung ist nur bei bestimmten allosterischen Enzymen möglich, die aus mehreren Untereinheiten bestehen und zu ihrem aktiven Zentrum noch ein räumlich entferntes regulatorisches oder allosterisches Zentrum besitzen. Die Inhibitoren, die Metabolite einer Reaktionskette sind, lagern sich reversibel daran an, verändern die Konformation des Enzyms und vermindern damit die Aktivität des aktiven Zentrums im Sinne einer Rückkopplungshemmung. Graphisch zeigt sich nicht mehr die einfache Michaelis-Menten-Beziehung, sondern eine sigmoide Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration. Dieser Mechanismus wird auch zur Enzymaktivierung ausgenützt.

1.6.6. Inhibitionskonstante K_i:

Um einen Hemmstoff nicht nur einem bestimmten Hemmtyp zuzuordnen, sondern analog zu K_m auch etwas über die Affinität des Hemmstoffs zum Enzym aussagen zu können, führt man K_i als Inhibitionskonstante bzw. als Dissoziationskonstante der Reaktion $E + I \rightleftharpoons EI$ ein.

$$\longrightarrow \quad K_i = \frac{[E][I]}{[EI]}$$

K_i sagt jedoch nur beim kompetitiven Hemmtyp direkt etwas über die Stärke der Hemmung des aktiven Zentrums aus (77), da hier die Affinität des Inhibitors direkt die Affinität des Substrats beeinträchtigt.
Rechnerisch erhält man K_i unter Erweiterung der Michaelis-Menten-Gleichung um den katalytisch inaktiven Enzym-Inhibitor-Komplex, also mit $E = E_{ges} - ES - EI$

$$\longrightarrow \quad v = \frac{v_{max} \cdot [S]}{K_m (1+[I]/K_i) + [S]}$$

$$\longrightarrow \quad 1/v = \frac{K_m}{v_{max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{max}}$$

Setzt man in dieser erweiterten Michaelis-Menten-Gleichung die Steigung der Geraden im Lineweaver-Burk-Diagramm = 0

$$\longrightarrow \quad \frac{K_m}{v_{max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) = 0$$

so folgt:

$$\longrightarrow \quad [I] = -K_i$$

Trägt man nun also in einem Sekundärdiagramm die Steigung der Geraden des Lineweaver-Burk-Diagramms für eine bestimmte Hemmstoffkonzentration gegen diese auf, so erhält man eine Gerade, deren Schnittpunkt mit der Abszisse direkt K_i ergibt.

Experimentell führt man also mehrere Meßreihen mit variierendem Substrat und variierendem Hemmstoff durch. Die Hemmstoffkonzentrationen, von denen man mindestens drei verschiedene (ohne die ungehemmte Kinetik) einsetzen sollte, sind über einen nichtgesättigten Bereich zu variieren, so daß man eine geringe, mittlere und hohe Hemmung erreicht, am besten zuerst auszuprobieren bei einer nichtgesättigten Substratkonzentration ungefähr im K_m-Bereich, um eine kompetitive Hemmung nicht zu übersehen.

Man zeichnet dann zuerst eine einfache Kinetik ohne Hemmung in ein Lineweaver-Burk-Diagramm und trägt dann die weiteren Meßreihen mit dem jeweils konstant gehaltenen Hemmstoff ein. Aus dem Verlauf der Geraden läßt sich der Hemmtyp und mit dem Sekundärdiagramm die Inhibitionskonstante festlegen.

Auf nähere praktische Einzelheiten und ihre Fehlermöglichkeiten bei der Erstellung einer Hemmkinetik wird dann bei der Beschreibung der Methodik eingegangen.

2. MATERIALIEN UND METHODIK

2.1. Materialien

2.1.1. Leber

Als Vorversuch wurde Lebermaterial einer männlichen 350 g schweren Ratte verwendet, das nach Perfusion mit eiskalter 1,15%-KCl-Lösung gewonnen und wie die menschliche Leber (s.u.) behandelt wurde (29).

Als eigentliches Versuchsmaterial wurden chirurgische Leberbiopsieproben von 6 Patienten (Tab. 3) verwendet, die während vier Cholecystektomien und zwei Tumoroperationen durch Keilexcision entnommen wurden und zwischen 0,5 - 2,0 g Feuchtgewicht hatten.[1)] Das Lebermaterial wurde in physiologischer Kochsalzlösung in einem Eisbehälter transportiert, dann sofort zwischen Filterpapier getrocknet, in die jeweiligen Tagesproben geteilt und einzeln abgewogen, so daß das Gewebe innerhalb einer Stunde bei -20°C in Aluminiumfolie eingefroren werden konnte. Die einzelnen Leberproben wurden dann zwischen dem 5. und 10. Tag nach dem Einfrieren (relative Enzymaktivitätskonstanz, 29) kurz aufgetaut und gleich zur Präparation der Mikrosomen, die jeden Tag neu erfolgte, weiterverwendet.

---

1) Für die Bereitstellung des Materials danke ich den Herren Prof. Dr. Koslowski, Prof. Dr. Kieninger, Prof. Dr. Kummer, Prof. Dr. Bähr, Priv. Doz. Dr. Bockhorn, Priv. Doz. Dr. Hettich von der Chirurgischen Universitäts-Klinik Tübingen.

2.1.2. Chemikalien und ihre Abkürzungen

7-EC	7-Äthoxycoumarin MG: 191	SIGMA CHEM. COMP. St. Louis, USA
Cyt c, ox.	Cytochrom c, oxidiert aus Pferdeherz Typ III	S.O.
NADPH	ß-Nicotinamidadenindinucleotidphosphat (reduziertes Na_4-Salz) MG: 833,4	BOEHRINGER Mannheim GmbH
Cim	Cimetidin = Tagamet^R MG: 252	SMITH KLINE DAUELSBERG Göttingen
Ran	Ranitidin MG: 351	mit freundl. Bereitstellung der Reinsubstanz durch GLAXO GROUP RESEARCH Ltd. Ware, Hertfordshire
Tris-HCl-Puffer	0,1 M Tris(hydroxymethyl)aminomethan-HCl-Puffer pH 7,6	
K-PO_4-Puffer	0,05 M K_2HPO_4-KH_2PO_4-Puffer pH 7,4	
----	1,15 % KCl-Lösung	
----	Methanol pro analysi 99,5 %	MERCK Art. 6009
----	KCN , MG: 65,12	
O_2-Gas		
Ampuwa	Steriles, pyrogenfreies Aqua ad injectabilia	

Reagenzien zur Proteinbestimmung nach LOWRY:

2 % Na_2CO_3 in 0,1 n NaOH
1 % $CuSO_4$ x 5 H_2O
2 % Na-K-Tartrat

Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz MERCK Nr. 9001

1 % Rinderserumalbumin als Standardlösung

1 µg/ml Quinine Sulfate Dihydrate in 0,1 n H_2SO_4 als Fluorometric Standard

Herstellung von Lösungen:

1) täglich neu, da leicht ausfällt:
   10^{-3}M 7-EC-Lösung: in 50 % wässr. Methanol + 0,1 M Tris-HCl-Puffer pH 7,6 im Verhältnis 1 : 20
   Das 7-EC wird in dem reinen Methanol mittels Rüttler ganz gelöst, erst dann kommt Ampuwa und Tris-HCl-Puffer im richtigen Verhältnis hinzu. Unter Schütteln und eventuell kurzem Erwärmen mit warmem Wasser aus der Wasserleitung ergibt sich eine klare Lösung, die vor Lichteinfall geschützt werden muß. Die Lösung wird anschließend 15 min mit O_2 begast.
2) 10^{-2}M NADPH-Lösung in 0,1 M Tris-HCl-Puffer pH 7,6.
   Diese Lösung ist eine Woche bei 4°C stabil.
3) 0,15 mM Cyt c, ox.-Lösung in 0,05 M K-PO_4-Puffer pH 7,4
4) 3 mM KCN-Lösung in 0,05 M K-PO_4-Puffer pH 7,4

Lösung 3) und 4) sind über mehrere Wochen bei 4°C stabil.

5) Cim-Ampulle mit 229 mg Cimetidin-hydrochlorid (= 200 mg Cimetidin) in 2 ml = 0,396 M Lösung
   Nach Absprache mit der Firma enhält die Ampulle als Lösungsmittel bidest. Wasser mit HCl leicht angesäuert auf pH 4,5 - 6; ansonsten keine Verunreinigungen, so daß hier Cimetidin als Reinsubstanz angesehen werden kann.
6) Ran - Lösung 20 % und 25 % = 0.57 M und 0.71 M Lösungen gelöst in 7)

7) Lösungmittel für Cim- und Ran-Lösungen bzw. dem Leerwert: Ampuwa mit HCl auf pH 4,5 - 6 leicht angesäuert.

Lösung 5) und 6) mit ihren Verdünnungen wurden nach spätestens 16 Tagen erneuert und währenddessen vor Lichteinfall geschützt, bei Zimmertemperatur aufbewahrt.

2.1.3. Geräte:

1) Ultrabeschaller SONIFIER^{R} B12, Branson-Sonic-Power Comp. Dabury, Connecticut USA
2) Kühlzentrifuge SORVALL^{R}, Du Pont Instruments, RC-5 Superspeed refrigerated Centrifuge
3) Ultrazentrifuge TGA-50 Kontron^{R} Tegimenta
4) Ultrazentrifuge Beckman^{R} L5-65

   3) und 4) mit Beckman Rotor 50.3 Ti

5) Aminco-Bowman^{R} Spectrophotofluorometer + Schreiber
6) DW - 2 UV-Vis Spectrophotometer Aminco^{R} + Schreiber
7) Spektrophotometer Eppendorf 1101 M
8) pH - Meter Fa. Knick, Berlin
9) Hewlett Packard HP - 97 Calculator
10) Taschenrechner Privileg SR 8D-NC Quelle

2.2. Methoden:

2.2.1. Präparation der Mikrosomen

Die jeweilige gefrorene Tagesprobe wurde auf der mit Eis gekühlten Aluminiumfolie mit einem Einmalskalpell in kleine Stücke zerschnitten, wobei das Lebergewebe auftaute. Dann wurde mittels eisgekühltem 0,1 M Tris-HCl-Puffer ein meist 4% Homogenat (40 mg Feuchtgewicht/ml), für Bindungsspektren ein 12,5% Homogenat, in einem Glas-Glas-Homogenisator nach Dounce mit 5 ml Füllungsvolumen (enges Spiel) durch 25-30 Auf- und Abwärtsbewegungen mit der Hand hergestellt. Nur wenn noch grobe Leberpartikel sichtbar waren, wurden bis zu 40 Auf- und Abwärtsbewegungen angewendet. Durch die Scherkräfte zwischen Glasstempel und Glaswand wurden die Zellen aufgebrochen. Laut Hoensch (29) ist bei menschlicher Leber im Gegensatz zur Rattenleber ein weiterer Aufschluß des Gewebes durch eine Ultraschallbehandlung notwendig, da sich menschliche Leber besonders mit hohem Bindegewebsanteil sehr schlecht von Hand homogenisieren läßt. So wurde das Leberhomogenat in Eppendorf-Hütchen mit ca. 1,5 ml Volumen verteilt und bei Eintauchen des Ultraschallkopfes des SONIFIERS (Gerät 1) durch Auf- und Abbewegungen des Eppendorf-Hütchens für 20 sec bei 30 Watt (Mirotip 1,5) beschallt. Hoensch (29) beschreibt dabei eine 30%-Aktivitätssteigerung des Enzyms EOD pro Feuchtgewicht, wobei die spezifische Aktivität unverändert bleibt, also die Enzymmenge gesteigert werden kann.

Es folgte eine differentielle Zentrifugation zur Erlangung der alleinigen Mikrosomenfraktion. Zuerst wurde das beschallte Homogenat in den Eppendorf-Hütchen in der vorgekühlten SORVALL-Kühlzentrifuge (Gerät 2) für 10 min bei 9000 g' bzw. 8750 Upm (Umdrehungen pro Minute) zentrifugiert, und dann das Sediment mit den großen Zellorganellen Kern, Mitochondrien und sonstigen Zelltrümmern verworfen. Der Überstand wurde in Polycarbonat-Ultrazentrifugen-Röhr-

chen mit 4 ml Füllungsvolumen für 60 min bei 99 000 g' bzw. 38 000 Upm in der Ultrazentrifuge Kontron oder Beckman (Gerät 3 u. 4) zentrifugiert. Jetzt wurde der Überstand, der noch aus Cytosol und Verunreinigungen bestand, verworfen, und man bekam als Sediment die reine Mikrosomenfraktion, die noch in einer weiteren Stufe von den letzten Resten Hämoglobin befreit wurde, indem sie in 1,15% eiskalter KCl-Lösung resuspendiert, mit 15 Auf- und Abwärtsbewegungen im Dounce-Glas-Glashomogenisator rehomogenisiert und dann in der Ultrazentrifuge (s.o.) für 30 min bei 99 000 g' erneut zentrifugiert wurde.

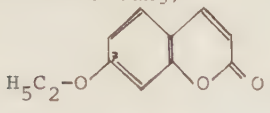
Die so gereinigte Mikrosomenfraktion wurde in der 9 000 g' Überstand entsprechenden Menge 0,1 M Tris-HCl-Puffer resuspendiert und mit 15 Auf- und Abwärtsbewegungen im Dounce-Homogenisator rehomogenisiert.
Bei der Erstellung des Materials für das Bindungsspektrum wurde das Sediment in geringerer Menge Puffer resuspendiert, um so noch höhere Enzymkonzentrationen bis 25% zu erhalten. Für die Enzymaktivitätsbestimmungen wurde mit Tris-HCl-Puffer auf eine 1% oder 2% Lösung verdünnt.

In dieser gereinigten Mikrosomenfraktion sind die Biotransformationsenzyme enthalten. Man hat zwar durch die vielen Präparationsschritte einen Gesamtenzymaktivitätsverlust von bis zu 60% bei EOD, jedoch steigen die spezifischen Aktivitäten gegenüber dem 9000 g'Überstand um das 3-fache an (29). Die Mikrosomen wurden während des Versuches im Eisbehälter aufbewahrt, um einen Aktivitätsverlust zu vermeiden (s. später).

2.2.2. Bestimmung der Enzymaktivität der 7-Äthoxycoumarin-O-Deäthylase (EOD)

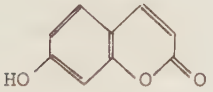
2.2.2.1. Enzymtestaufbau

Die Methode wurde von Ullrich und Weber (80) übernommen. 7-EC dient hier als Modellsubstrat für die EOD, eines der Biotransformationsenzyme in den Mikrosomen. Die Reaktion erfolgt nach dem Schema einer Monooxygenase-Reaktion: (s. Einleitung)



7 - EC

$$+ O_2 + NADPH + H^+ \xrightarrow[\text{Cyt P450}]{\text{EOD}}$$

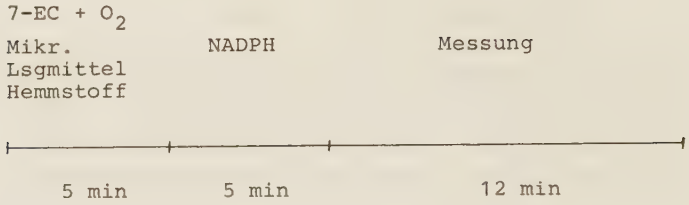


7-Hydroxycoumarin
= Umbelliferon

$$+ H_3C-C\begin{matrix}O\\ \diagdown\\ H\end{matrix} + NADP^+ + H_2O$$

In Mikro-Quarz-Küvette	Leerwert ml	Probe ml	Konzentration im Testansatz
7-EC 10^{-3}M	0,05	0,05	$0{,}48\times10^{-3}$M
1-2% Mikrosomensuspens.	0,05	0,05	
Lösungsmittel	0,002	---	
Cim - Lsg	---	0,002	$0{,}38\times10^{-3}$M $1{,}52\times10^{-3}$M
oder			$3{,}81\times10^{-3}$M
Ran - Lsg	---	0,002	$1{,}1\times10^{-3}$M) $2{,}19\times10^{-3}$M) Pat I,II $5{,}48\times10^{-3}$M)
			$1{,}71\times10^{-3}$M) $3{,}43\times10^{-3}$M) Pat III $6{,}85\times10^{-3}$M)
Mischen, 5 min Äquilibration bei 37° C			
Starten der Reaktion mit NADPH 10^{-2}M	0,002	0,002	$0{,}19\times10^{-3}$M
Nach 5 min Äquilibration Messung der Enzymaktivität			

Die Reaktion als Flußdiagramm:



2.2.2.2. Messung der Enzymaktivität

Das entstehende Produkt Umbelliferon fluoresziert bei einer Anregungswellenlänge von 380 nm mit einer Wellenlänge von 450 nm. Nach Kontrolle der Nullinie vor dem Starten wurde der Anstieg dieser Fluoreszenzintensität mit der Zeit nach dem Starten bei obigen Wellenlängen mit einem Spectrophotofluorometer (Gerät 5) mit der Blendeneinstellung 1-0,5-0,5 registriert, der zuvor mit der Chininsulfat-Standard-Lösung geeicht wurde. Die Umsatz-Zeit-Kurve wurde direkt mit einem Schreiber aufgezeichnet und ergab nach 5 min einen linearen Anstieg als Ausdruck der steady state Phase (s.vorn), der über 12 min registriert wurde.

2.2.2.3. Berechnung der Enzymaktivität

Bei der sehr empfindlichen Fluoreszenzspektroskopischen Messung gehorcht die emittierte Sekundärstrahlung bei verdünnten Lösungen und bei einer festen Wellenlänge dem Lambert-Beerschen-Gesetz: $E = \varepsilon \cdot c \cdot d$, so daß $E \sim c$. Durch Erstellung einer Eichkurve mit bestimmten Konzentrationen Umbelliferon umgeht man die Berechnung des stoffspezifischen molaren Extinktionskoeffizienten ε.
Nach einer Standardreihe von Hoensch (29) ergeben 100 pM Umbelliferon/0,5 ml Inkubationsvolumen einen mittleren

Anstieg von 23,51 l.b. (= little boxes = relative Fluoreszenz-einheiten).

Zur Berechnung der Anfangsgeschwindigkeit (s. vorn u. 3) legt man die Tangente an die Umsatz-Zeit-Kurve bzw. bestimmt die Steigung der Geraden/min = slope/min.

So gilt:

$$\frac{\text{'slope'/min} \cdot 400}{23{,}51 \cdot y \cdot z \text{ mg Prot/10 mg Leber}} = x \text{ pM Umb./min/mg Prot}$$

x: Menge des entstehenden Produkts Umbelliferon in pM

y: eingesetzte Konzentration der Mikrosomensuspension in g% = g Leber/100 ml Tris-HCl-Puffer

z: nach Lowry gemessene Proteinmenge der Mikrosomensuspension in mg/10mg Leber

pM Umb. / min/mg Prot = spezifische Aktivität der EOD (laut Definition, s. vorn).

2.2.3. Bestimmung der Enzymaktivität der NADPH-Cyt c-Reduktase (kurz: Reduktase)

2.2.3.1. Enzymtestaufbau

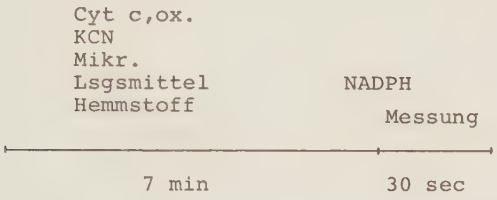
Die NADPH-Cyt P450-Reduktase wurde schon in der Einleitung als ein entscheidendes Hilfsenzym für das Cyt P450 zur Umsetzung des Substrats beschrieben. Es liefert bei der Monooxygenasereaktion durch die Oxidation von NADPH zwei Reduktionsäquivalente und reduziert damit Cyt P450, das erst im reduzierten Zustand O_2 binden und nachher H_2O abgeben kann. Indirekt wird die Reduktase also bei jeder Monooxygenase-Bestimmung, auch bei EOD (2.2.2.) mitgemessen. Isoliert kann man dieses Enzym als Cyt c-Reduktase bestimmen, das als prosthetische Gruppe FAD besitzt. Die Methode wurde dabei von Williams und Kamin (89) übernommen. Hier ist also das oxidierte Cyt c der Akzeptor für die Reduktionsäquivalente vom NADPH, wobei das zentrale Fe^{3+}-Atom zum Fe^{2+} reduziert wird.

In Halbmikroküvette	Leerwert ml	Probe ml	Konzentration im Testansatz
Cyt c,ox $0{,}15\times10^{-3}$M	0,2	0,2	$0{,}05\times10^{-3}$M
KCN $3{,}0\times10^{-3}$M	0,2	0,2	$0{,}98\times10^{-3}$M
K-PO_4-Puffer pH 7,4 $0{,}05\times10^{-3}$M	0,1	0,1	$0{,}008\times10^{-3}$M
1% Mikrosomensuspension	0,1	0,1	
Lösungsmittel	0,01	---	
Cim - Lsg	---	0,01	$0{,}32\times10^{-3}$M $1{,}28\times10^{-3}$M $3{,}20\times10^{-3}$M
oder			
Ran - Lsg	---	0,01	$2{,}30\times10^{-3}$M $5{,}75\times10^{-3}$M $11{,}49\times10^{-3}$M
Mischen, 7 min Äquilibration bei 37°C			
Starten der Reaktion mit NADPH 10^{-2}M, sofortige Messung	0,01	0,01	$0{,}16\times10^{-3}$M

Es gilt folgende Reaktionsgleichung:

$$\text{Cyt c,ox.}^{Fe^{3+}} + \text{NADPH} + H^+ \xrightarrow[KCN]{\text{Reduktase}} \text{Cyt c,red}^{Fe^{2+}} + NADP^+$$

Die Reaktion als Flußdiagramm:



2.2.3.2. Messung der Enzymaktivität

Sie erfolgte nach der Methode der Doppelwellenlängen-Spektralphotometrie (3) mit einem DW 2-Spectrophotometer (Gerät 6). Damit kann man auch nur geringfügige spektrale Unterschiede zwischen Substrat und Produkt über einer hohen Grundabsorption erfassen und damit das reduzierte Cyt c getrennt vom oxidierten Cyt c bestimmen. Bei der Meßwellenlänge 550 nm zeigen die Absorptionsspektren von oxidiertem und reduziertem Cyt c die größte Differenz. Die Referenzwellenlänge von 504 nm stellt den isosbestischen Punkt der Lösung dar, bei dem oxidiertes und reduziertes Cyt c die gleiche Absorption zeigen. (unveröffentlicher Versuch Dr. Hoensch). Bei abwechselndem Durchtreten der Lichtstrahlen beider Wellenlängen durch die Küvette wird die Differenz der Strahlenintensität hinter der Küvette zur Absorptions- und damit Konzentrationsmessung von reduziertem Cyt c verwendet. Die Küvette enthält also Proben- und Leerwert gleichzeitig.

Bei Registrierung der Nullinie mit obigen Wellenlängen und einem Lichtspalt von 2,0 wurden geringe lineare Abweichungen der Extinktion mit der Zeit beobachtet, die nachher rechnerisch berücksichtigt wurden. Nach dem Starten der Reaktion ergab die Aufzeichnung der Extinktion in Abhängigkeit von der Zeit einen linearen Anstieg, auch hier Ausdruck der steady state Phase, der über 30 sec registriert wurde.

2.2.3.3. Berechnung der Enzymaktivität

Es gilt wieder das Lambert-Beersche-Gesetz mit $E = \varepsilon \cdot c \cdot d$. Der millimolare Extinktionskoeffizient von reduziertem Cyt c ist nach Williams und Kamin (89) $\varepsilon = 21\ mM^{-1}cm^{-1}$. Die Schichtdicke der Küvette ist d = 1 cm. Die Extinktionsdifferenz des initialen Anstiegs wurde innerhalb der ersten 10 sec gemessen und als 'slope'/min ausgedrückt, korrigiert um den jeweiligen Nullinien-Wert.

$$\frac{285{,}7 \cdot \text{'slope'/min}}{y \cdot z \text{ mg Prot/10 mg Leber}} = x \text{ nM Cyt c,red./min/mg Prot}$$

x : Menge des entstehenden Produkts Cyt c,red. in nM

y : eingesetzte Konzentration der Mikrosomensuspension in g% = g Leber/100 ml Tris-HCl-Puffer

z : nach Lowry gemessene Proteinmenge der Mikrosomensuspension in mg/10 mg Leber

nM Cyt c,red/min/mg Prot = spezifische Aktivität der Reduktase

2.2.4. Proteinbestimmung nach LOWRY (45)

Die Prozentangaben bei der Mikrosomensuspension können nur ein Anhaltspunkt für das tatsächliche Feuchtgewicht der Leber in der Lösung sein, da beim Homogenisieren doch unterschiedlich viel Verlust entsteht. Als weiteres enthalten die gleichen Lebermengen von verschiedenen Patienten unterschiedliche Enzymmengen (unterschiedliche Struktur, Bindegewebsanteil etc.). So kann man die Enzymaktivitäten verschiedener Patienten am besten vergleichen, indem man sie als spezifische Aktivität pro mg Enzymprotein ausdrückt. Die Gesamtproteinbestimmung in den Mikrosomen erfaßt zum größten Teil die Enzymproteine. Strukturproteine machen nur einen geringen Anteil aus (3).

Die Methode nach LOWRY beruht darauf, daß das Protein in 10 min zuerst mit Cu reagiert und zwar in einer alkalischen Lösung, und dann das Cu-Protein bei schneller Zugabe des Folin-Reagenzes dieses nach 30 min maximal reduziert hat. Dadurch entsteht eine blaue Farbe, die spektrophotometrisch bei 772 nm bestimmt wird und mit der Proteinkonzentration, allerdings nicht ganz linear, korreliert (45).

Der Reaktionsvorgang stellt sich so dar:

```
     (   1% CuSO4
5 ml (  +2% Na-K-Tartrat          0,5 ml
     (  +2% Na2CO3 in 0,1n NaOH   Folin-Reagenz

1 ml     Proteinlösung            1:2 verdünnt      Messung

         |-------------------|----------------------------|
                10 min              mind. 30 min    (Gerät 7)
```

Jede Probe wurde in zwei verschiedenen Konzentrationen und diese jeweils als Doppelbestimmung angesetzt.

Der zugehörige Leerwert wurde mit der entsprechenden 0,1 M Tris-HCl-Puffer-Konzentration angesetzt, da Tris-Puffer allein schon eine Farbreaktion mit den Lowry-Reagenzien ergab. Auch die Leerwerte und Standardwerte wurden als Doppelbestimmung ermittelt.
Eine Eichkurve wurde mit 1%-Rinderserumalbuminlösung mit Ampuwa als Leerwert in drei verschiedenen Konzentrationen erstellt: 0,02; 0,04; 0,05 mg Prot/Ansatz.

Berechnung:
An der erstellten Eichkurve, die eine Ursprungsgerade durch die drei Standardmeßpunkte ergab, wurde zur gemessenen Probenextinktion der zugehörige Wert in mg Prot/Ansatz abgelesen. Dieser Wert wurde unter Berücksichtigung der eingesetzten Mikrosomenfraktion auf mg Prot/ml Mikrosomen bzw. mg Prot/10 mg Leberfeuchtgewicht umgerechnet.

2.2.5. Erstellung einer Enzym- und Hemmkinetik und ihre Fehlerquellen

Es werden noch einige praktische Einzelheiten und ihre eventuellen Fehlermöglichkeiten bei der vorher bereits geschilderten Erstellung einer Enzymkinetik beschrieben.

Zuerst wurde eine Substratverdünnungsreihe erstellt aus einer Stammlösung für jede Enzymbestimmung, also eine 10^{-3} M 7-EC-Lösung bzw. eine 0,15 mM Cyt c,ox.-Lösung. Diese Lösungen waren die höchst eingesetzten Substratkonzentrationen und ergaben für das Enzym auch Substratsättigung. Die 7-EC-Lösung und ihre Verdünnungen wurden während des Versuches in einem Wasserbad mit 37° C lichtgeschützt aufbewahrt, um die Lösungen stabil zu halten; die Cyt c,ox.-Lösungen im Eisbehälter.

Die EOD-Bestimmung erfolgte mit 6 Substratverdünnungen von 24 - 481 µM Konzentration im Ansatz, bei der Reduktase-Bestimmung waren es 8 Substratverdünnungen von 4 - 48 µM Konzentration im Ansatz pro Meßreihe. Jede Substratkonzentration entstand durch Verdünnen einer Stammlösung mit dem jeweiligen Puffer, wobei der Tris-HCl-Puffer für die 7-EC-Lösungen vorher 15 min mit O_2 begast wurde.
(Verminderung von Pipettierfehlern, 3).
Der EOD- und der Reduktase-Enzymtest wurde wie vorn beschrieben mit jeweils konstanten Volumina der verschiedenen Substratkonzentrationen durchgeführt (Vermeidung von Temperatur-, pH-, Ionenstärke- und Volumeneffekte, 3), und man erhielt so für jede Substratkonzentration eine lineare Umsatz-Zeit-Kurve. Die Mikrosomenkonzentration blieb konstant 1% für EOD und Reduktase bei Patient I,II und IV, bei Patient III wegen geringerer Aktivität der EOD 2%.

Bei der Theorie der Enzymkinetik haben wir bisher nur Einsubstratreaktionen mit der Reaktionsfolge $E + S \rightleftharpoons ES \rightarrow E + P$ (s.vorn) betrachtet. Genaugenommen stellen aber die Monooxygenasereaktionen, hier speziell die EOD-Reaktion und die Reduktase-Reaktion, Mehrsubstratreaktionen dar, da sie beide das Coenzym NADPH als zweites Substrat benötigen. Dieses Problem kann man umgehen, indem man ein Substrat im Überschuß einsetzt, so daß sich die Konzentration im Verlauf der Reaktion praktisch nicht ändert. Aus einer Reaktion 2. Ordnung wird wieder eine Reaktion (Pseudo-) 1. Ordnung (3).
Diese Voraussetzung ist bei den Versuchen gewährleistet, da NADPH mit 0,19 mM bei der EOD, mit 0,16 mM bei der Reduktase gesättigt ist (29).
Ebenso liegt auch der O_2 bei der EOD-Reaktion im Überschuß vor.

Zur Erstellung der Hemmkinetik wurde anstatt von Lösungsmittel wie beim Leerwert zu jeder Substratkonzentration je drei verschiedene Konzentrationen von Cimetidin (von 0,38 mM bis 3,8 mM bei EOD, von 0,32 mM bis 3,2 mM bei Reduktase) und Ranitidin (von 1,1 mM bis 6,85 mM bei EOD, von 2,3 mM bis 11,5 mM bei Reduktase) (s. Tab. 1 u. 2) hinzugegeben.
Es wurde weiter von jeder Umsatz-Zeit Kurve die Anfangsgeschwindigkeit als Steigung der Tangente an die Umsatz-Zeit-Kurve zur Zeit t=O bestimmt, ausgedrückt in pM Umbelliferon/min/mg Prot bzw. nM Cyt c,red./min/mg Prot.
Durch die Wahl der Enzym- und Substratkonzentrationen ergaben sich immer lineare Umsatz-Zeit-Kurven in der steady state Phase, so daß hier wohl von keiner Unterschätzung der Anfangsgeschwindigkeit bei niedrigen Substratkonzentration ausgegangen werden kann (3).

Es ergab sich jedoch die Schwierigkeit eines Enzymaktivitätsabfalls mit der Zeit (s. Abb. 13). Da bei der EOD-Bestimmung schon ein Enzymdurchlauf 25 min dauerte, ergäbe sich eine grobe Verfälschung der Meßwerte. Um dies zu umgehen, wurden bei der EOD an einem Versuchstag nur zwei Substratkonzentrationen mit den 6 Hemmstoff- und der einen Leerwert-Konzentration untersucht. Dabei bestimmte ich an jedem Versuchstag gleich nach der Präparation der Mikrosomen 2 Enzymmessungen mit den 2 Substratkonzentrationen und dem Leerwert-Zusatz, wobei dieser Zeitpunkt einer 100%-Enzymaktivität entsprach. Vor jeweils 2 nachfolgenden Enzymmessungen mit verschiedenen Hemmstoffkonzentrationen (im folgenden Hemm-Bestimmungen genannt) wurde erneut eine Enzymmessung mit der jeweiligen Substratkonzentration und Leerwert-Zusatz (im folgenden Leerwert-Bestimmung genannt) durchgeführt. Diese Leerwert-Bestimmungen wiederholten sich also immer nach zwei Hemm-Bestimmungen und ergaben mit dem jeweiligen Zeitabstand die Meßwerte für die Zeitabhängigkeit der Enzymaktivität (Tab. 13).

Die zwischenzeitlichen Hemm-Bestimmungen wurden als prozentuale Hemmung zur maximal zwei Enzymmessungen (=ca. 50 min) vorher bestimmten Leerwert-Bestimmung ausgedrückt. Da die prozentuale Hemmung unabhängig von der Zeit ist, konnte man sie auf die allerersten Leerwert-Bestimmungen mit zeitlich 100%-Enzymaktivität beziehen und erhielt dadurch die zeitunabhängigen korrigierten Anfangsgeschwindigkeiten, mit denen im weiteren die Kinetiken erstellt wurden.

Als Beispiel: (LW=Leerwert)
(S=Substratkonzentration)

100%-Enzymaktivität { Zeitpunkt O: S(481µM) + LW ⟶ $\frac{dP}{dt}$ = 301pM/min/mg Prot
" 25 min : S(240,5 µM) + LW ⟶ " = 261" " "
" 3 h : S(481µM) + LW ⟶ " = 229" " "

=68,5% Hemmung { "3h 25 min : S(481µM) + Cim 1,5mM ⟶ " = 157" " "

==> 68,5% von 301 pM/min/mg Prot = 206 pM/min/mg Prot
= korrigierte Anfangsgeschwindigkeit mit Cim 1,5 mM.
Man hat in diesem Fall nach 3h einen Enzymaktivitätsabfall um 24% (von 301 auf 229pM/min/mg Prot).

Während der 8,5 h Messungen an einem solchen Versuchstag mußte das Fluormeter nach Erproben und Absprache mit der herstellenden Firma nicht nachkalibriert werden. Die Erstellung einer gesamten EOD-Hemmkinetik eines Patienten lief also über drei Versuchstage.

Bei der Reduktase-Messung ergaben sich die gleichen Probleme, allerdings konnte hier eine gesamte Hemmkinetik an einem Tag durchgeführt werden, da ein Enzymlauf nur 8 Minuten benötigte und auch versetzt vorinkubiert werden konnte. So wurden die Leerwert-Bestimmungen erst nach jeweils 6 Hemm-Bestimmungen dazwischen geschaltet. Die Zeitkorrektur erfolgte analog zur EOD.

Die korrigierten Anfangsgeschwindigkeiten wurden in Abhängigkeit von der Substratkonzentration mit den jeweiligen Hemmstoffkonzentrationen aufgezeichnet und an der hyperbolen Sättigungskurve überprüft, ob die Enzyme der Michaelis-Menten-Kinetik gehorchen. Zur Bestimmung von K_m und v_{max} diente das Lineweaver-Burk-Diagramm.
Hier ergibt sich nun das Problem der statistischen Behandlung der Meßwerte. Laut Bisswanger (3) ist ein Ergebnis, das erst durch die Statistik an Wert gewinnt, sinnlos. Jedoch sind die Werte in einem Lineweaver-Burk-Diagramm nicht gleichberechtigt anzusehen. Sie werden durch diese Form der Auftragung recht verzerrt dargestellt. Zitat Bisswanger (3): "Die Meßpunkte drängen sich im Sättigungsbereich, während der schwerer zugängliche niedere Substratbereich stark gedehnt und die hier liegenden Meßpunkte scheinbar überbewertet werden. Entsprechend nehmen auch die Fehlergrenzen in dieser Richtung stark zu."
Weiterhin liegen auch im experimentellen Ansatz viele Fehlermöglichkeiten, die schon allein beim Pipettieren zwischen 1% und 10% liegen (3). Solang dies jedoch konstante absolute Fehler sind, die also über den gesamten Meßbereich gleich verteilt sind, ist es noch tolerabel. Konstante relative Fehler, wie z.B. die Schwankungen des Photometers bei zunehmender Sättigung der Lösung, die seine Empfindlichkeit herabsetzt oder die Schwankungen der Substratmenge besonders im substratarmen Bereich, bewirken eine Verzerrung der Werte zueinander. Trotzdem erschien es mir bei meinen Versuchen am besten, ohne spezielle Wichtung der Punkte (88) eine Regressionsanalyse nach der Summe der kleinsten Fehlerquadrate durchzuführen. Dadurch wird ein Hauptfehler, besonders bei der EOD-Messung, am besten ausgeglichen, nämlich die Bestimmung der verschiedenen Substratkonzentrationen an verschiedenen Tagen mit jeweils frisch hergestelltem Mikrosomenmaterial. Es wurde dabei mehr Wert auf die Unterschiede in den Hemmstoffkonzentrationen gelegt und deshalb diese an einem Tag ausgeführt.

Ein weiterer Vorteil einer durch den Hewlett Packard Calculator (Gerät 9) erstellten linearen Regression (Programm 'curve fitting') besteht in dem Regressionskoeffizienten r, durch den objektiv das Ausmaß der Angleichung der Meßpunkte an die Gerade ausgedrückt wird, und man damit ein Maß für die Gültigkeit des Michaelis-Menten-Gesetzes hat.

2.2.6. Erstellung eines Bindungs- oder Differenzspektrums

Damit ein Stoff ein Enzym reversibel hemmen kann, muß er sich an dieses Enzym binden und kann dann das aktive Zentrum beeinflussen. Dies drückt sich unter Umständen in einem Bindungsspektrum aus, mit dessen Hilfe man spezifische von unspezifischen Inhibitoren, die sich nicht an das Enzym anlagern, unterscheiden kann (77). Eine Bindung von Liganden kann durch Konformationsänderung des Enzyms eine "spektrale Verschiebung oder Intensitätsänderung von wenigen Prozenten der Grundabsorption" (3) bewirken.

So beschreiben Remmer und Schenkman (63 und 69) zwei charakteristische Formen von spektraler Veränderung bei Rattenmikrosomen, deren Größe sowohl von der Substrat- als auch von der Enzymkonzentration abhängt:
Zum einen den Typ I, der einen Wellenberg bei 385-390 nm und ein Wellental bei 420 nm aufweist. Dieses Spektrum entsteht bei Bindung von Substanzen wie Aminopyrin, Cyclohexan (79), Barbituraten und Chlorpromazin (69). Bei diesen Stoffen ergibt sich auch, daß dieselbe Substratkonzentration einmal halbmaximale Enzymaktivität hervorruft ($=K_m$), zum andern halbmaximale spektrale Veränderungen zeigt. Daraus folgert Schenkman (69), daß die spektrale Veränderung auf der Bildung eines Enzym-Substrat-Komplexes beruht. Für diesen ist ja das Cyt P-450 verantwortlich, an dem also sowohl das Substrat umgesetzt wird, als auch bei dessen Bindung eine spektrale Veränderung eintritt. So ist für

die Amplitude des Bindungsspektrums zum einen die Substratart und -menge, aber auch die Cyt P-450-Menge entscheidend, das sich auch bei Induktionsversuchen zeigte, wo in gleichem Ausmaß Menge an Cyt P-450 wie Bindung des Substrats, erkennbar an Amplitude des Bindungsspektrums, anstieg (69). Über den genauen Angriffspunkt des Substrats am Cyt P-450 gibt es verschiedene Hypothesen (63, 69). So sollen die Substanzen, die ein Typ I-Bindungsspektrum hervorrufen nahe dem Häm-Fe binden, wobei wohl Substratbindungs- und Substratumsetzungsstelle identisch sind, und von da aus die Polarität des 6. Häm-Liganden steigern und den Elektronenfluß zum Cyt P-450 erleichtern (67, 68), womit die Cyt P-450-Reduktion beschleunigt wird (=pos.modifier effect).

Der Typ II des Bindungsspektrums weist einen Wellenberg bei 430 nm und ein Wellental bei 390 nm auf und wird bei Bindung von Aminsubstanzen wie Anilin, Pyridin, von Ketonen und Imidazolen erzeugt (6). Auffällig ist, daß bei Anilin K_m- und K_s-Wert, der die halbmaximale spektrale Veränderung beschreibt, im Gegensatz zum Typ I nicht übereinstimmen (69), so daß also die Bindung von Anilin an anderer Stelle wie die Substratumsetzung stattfinden muß. Es wird wohl direkt am Fe-Atom des Cyt P-450 angreifen, auf der gleichen Seite, wo der Sauerstoff gebunden wird, da Anilin CO, das anstelle von O_2 gebunden werden kann, aus dem Komplex mit Cyt P-450 verdrängt (69).

Schenkman beschreibt als drittes noch einen modifizierten Typ II (69), den er später den 'reverse Typ I' (68) nennt, der durch Bindung von Substanzen wie Cortisol, Cyanid, Phenacetin oder Butanol erzeugt wird, die nicht unbedingt selbst Substrat sind. Dieses Spektrum besitzt seinen Wellenberg bei 419 nm und sein Wellental bei 390 nm. Da diese Substanzen CO nicht vom Cyt verdrängen können, binden sie nicht an das Fe-Atom. Ebenso stimmen K_m und K_s nicht überein, so daß ihre Bindung nicht mit ihrem Metabolismus ver-

knüpft ist, sie also an einer anderen, als der Substratumsetzungsstelle gebunden werden. Ihre Bindung entspricht einer Verdrängung von bereits früher gebundenen Typ I-Substanzen. Interessant ist, daß Substanzen vom Typ I wie Hexobarbital in sehr hohen Konzentrationen einen 'reverse Typ I' zeigen, da jetzt auch auf dieser anderen Seite des Cyt ochroms Konzentrationen erreicht werden, die einen 'reverse Typ I' auslösen.

Alle Stoffe, die ein Bindungsspektrum auslösen, müssen aber nicht unbedingt selbst Substrat sein. Das Bindungsspektrum ist nur Ausdruck einer spezifischen Bindung eines Stoffes an ein Enzym, mit Erfassung der Affinitätsstärke des Stoffes zum Enzym, aber ohne sichere Aussage über das weitere Schicksal des gebundenen Moleküls bzw. die Beeinflussung des Enzymmoleküls (90).

Bei der qualitativen Darstellung eines Bindungsspektrums ist zu beachten, daß die eingesetzte Enzymproteinkonzentration in der Küvette so hoch als möglich ist, damit der gesamte Ligand gleich gebunden (3), und damit der Meßeffekt maximal wird. So wurde in meinen Versuchen die Mikrosomen aus einem 25%-Leberhomogenat gewonnen (s.2.2.1.), was beim Cimetidin-Versuch eine Proteinkonzentration von 3,1 mg Prot/ml, beim Ranitidin-Versuch von 2,1 mg/ml ergab. Ebenso waren die eingesetzten Ligandkonzentrationen von Cimetidin mit 12,77 mM und Ranitidin mit 22,98 mM sehr hoch gewählt, um einen deutlichen Ausschlag zu erhalten. Die Messung erfolgte nach der Doppelstrahlmethode (3) mit dem auf 'Split' geeichten Spektrophotometer (Gerät 6). Bei dieser Methode fällt der Lichtstrahl mit der jeweiligen Wellenlänge abwechselnd durch eine von zwei Küvetten mit gleicher Konzentration und Volumen an Enzymprotein, wobei für jede Wellenlänge die Extinktionsdifferenz zwischen beiden Küvetten aufgetragen wird. Nach Korrektur der Basislinie, die gleiche Absorption beider Küvetten anzeigt, gibt man in eine Küvette, der Probenküvette, ein kleines

Volumen des Liganden, hier also Cimetidin bzw. Ranitidin, und in die andere Küvette, der Referenzküvette, das entsprechende Volumen an Lösungsmittel des Liganden. Bei Zimmertemperatur wird nun das Differenz- oder Bindungsspektrum in dem Bereich von 360 nm bis 480 nm direkt registriert.

3. V E R S U C H S E R G E B N I S S E

3.1. Zeitabhängigkeit der Enzymaktivität in fertig präparierten Mikrosomen

Schon Ullrich, Frommer und Weber (81) geben bei der Messung von der EOD-Aktivität in Lebermikrosomen von 3-Methylcholanthren-und Phenobarbital-vorbehandelten Ratten einen Abfall der Aktivität in Abhängigkeit von der Zeit nach Mikrosomenfertigstellung an, bei Aufbewahrung der Mikrosomen bei O°C. Dieser Abfall beträgt in den ersten 3 Stunden schon 25-50% und verläuft dann langsamer.

So bestimmte ich bei menschlichen Lebermikrosomen im Verlauf einer EOD-Aktivitätsmeßreihe nach jeweils 2-3 Hemm-Bestimmungen 1 Leerwert-Bestimmung mit der gleichen Substratkonzentration (s.2.2.5.), die 3-4 Meßpunkte für die Bestimmung der zeitlichen Abhängigkeit der Enzymaktivität darstellten. Exemplarisch für die Kurvenschar, die sich mit verschiedenen Substratkonzentrationen ergab, zeigt Abb. 13 das Verhalten der EOD-Aktivität von Lebermikrosomen des Pat. I (Tab. 3) mit einer 7-EC-Konzentration von 240,5µM über 9 Stunden nach Mikrosomenfertigstellung bei Aufbewahrung der Mikrosomen im Eisbehälter. Es ergibt sich nach 9 Stunden ein Aktivitätsverlust der EOD um 44%.
Auf Grund dessen wurden die ermittelten Anfangsgeschwindigkeiten, so wie bei 2.2.5. beschrieben, korrigiert.

3.2. Die O-Desalkylierungsrate von 7-Äthoxycoumarin mit Lebermikrosomen bei Ratten

Zum Erlernen der Methodik wurde als Versuchsmaterial zuerst Rattenlebermikrosomen verwendet. Mit einer Substratkonzentration von $5x10^{-4}$M bis $5x10^{-6}$M und ohne Hemmstoffzugabe ergab sich die Kinetik der Abb. O in der Lineweaver-Burk-Darstellung. Die Werte für K_m bzw. v_{max} bekam man durch Schnitt der mittels Packard Calculator ermittelten Regressionsgeraden (s.2.2.5.) mit der Abszisse bzw. Ordinate. Dabei zeigte sich bei den Substratkonzentrationen von $5x10^{-4}$M bis $1x10^{-4}$M eine kleinere Affinität des Substrats zum Enzym als bei Substratkonzentrationen kleiner $5x10^{-5}$M, was sich graphisch als steilere Regressionsgerade mit K_{m1} von 208,33 µM im Gegensatz zum K_{m2} von 19,16 µM mit flacher Regressionsgeraden bei niedrigeren Substratkonzentrationen darstellte.

In Abb. O wurde nur erstere aufgezeichnet mit einem Regressionskoeffizienten von 0,99, dessen hoher Wert für die Gültigkeit der Michaelis-Menten-Gleichung für die EOD bei Ratten spricht. Das Phänomen von zwei verschiedenen Substrataffinitäten in Abhängigkeit von ihrer Konzentration wurde bereits bei Ullrich für Mäuse (80) und für Ratten (81) dargestellt und mit dem Vorhandensein von verschiedenen Cyt P-450-abhängigen Monooxygenasen erklärt.

3.3. Die O-Desalkylierungsrate von 7-Äthoxycoumarin mit Lebermikrosomen beim Menschen

In Tab. 3 sind einzelne Daten der 6 Patienten aufgeführt, um deren Leber und damit die Enzyme besser beurteilen zu können. Bei den 4 Gallenblasenoperationen ergab die Histologie unauffällige, in 2 Fällen Fettlebern, bei den 2 Tumoroperationen keine Metastasenbildung in der Leber. Die Leberenzyme sind bei Bestimmungen vor der Operation teilweise doch erhöht, was auf geringe Leberschädigungen hinweist, wie z.B. bei Pat. II, der wohl als Folge des Steinleidens eine chronische Cholecystitis mit Schrumpfgallenblase und auch eine extrahepatische Verschlußsymptomatik, eventuell durch Konkremente, mit erhöhter γ-GT und AP entwickelt hat, sofern man das allein aus den Laborparametern diagnostizieren darf. Auch Pat. VI zeigt nach den Laborwerten eine Verschlußsymptomatik. Bei Pat. I ergab sich erst kurz vor der Operation ein Enzymanstieg. Inwieweit man diese Laborparameter im Hinblick auf einen richtigen Leberschaden und damit auch auf eine Beeinflussung der im folgenden gemessenen Monooxygenase- und Reduktase-Funktion interpretieren darf, ist unklar.

Desgleichen mit den Angaben über Medikamenteneinnahme und Alkohol- und Nikotingenuß der Patienten, das alles unter bestimmten Umständen Leberenzyme induzieren oder hemmen könnte. Jedoch waren Alkohol- und Nikotinangaben nicht vollständig zu erheben, desgleichen sind die angegebenen Medikamente nicht eindeutig als Enzyminduktoren oder -hemmer bekannt. Ein Medikament, das eindeutig Leberenzyme induziert, ist das zur Narkose verwendete Thiopental, das aber in der einmaligen Dosisgabe zu Beginn der Operation wohl keinen Einfluß auf die Leberenzyme hat. Insgesamt ergeben sich also für die absoluten Enzymaktivitätswerte schon Unterschiede zwischen den Patienten, auf Grund von Medikamenten, Alkohol, Nikotin, eventuellen

'Leberschäden', aber auch schon allein durch individuelle Unterschiede, wie nicht zuletzt Alter und Geschlecht (s.1.2.). Diese Untersuchung ist aber mehr auf die relative Wirkung von Cimetidin und Ranitidin auf die Leberenzyme jedes einzelnen Patienten ausgerichtet, und so wurde auch auf eine etwaige statistische Zusammenfassung der Patientenergebnisse, schon auf Grund des relativ geringen Patientenkollektivs, verzichtet.

Im folgenden sind also für jeden Patienten getrennt die Kinetik seiner Enzyme mit Hemmwirkung von Cimetidin und Ranitidin aufgeführt. In Tab. 1 werden die einzelnen Meßwerte reziprok für die EOD-Kinetik mit jeweiliger Hemmung für Pat. I bis III dargestellt (s.1.5. und 2.2.5.). Diese Werte sind nun als Lineweaver-Burk-Diagramm in Abb. 1 und 2 für Pat. I, in Abb. 4 und 5 für Pat. II und in Abb. 7 und 8 für Pat. III, jeweils für Cimetidin und Ranitidin getrennt, aufgezeichnet und durch Regressionsgeraden miteinander verbunden. Die Zahlen in Klammern bei den Legenden geben die Regressionskoeffizienten an. Mittels dieser Annäherung der reziproken Werte an Geraden, ebenso mittels der hyperbolen Sättigungskurve, die sich bei einfacher Darstellung der Werte ergibt, zeigt sich die Gültigkeit der Michaelis-Menten-Gleichung für die EOD beim Menschen. Eine weitere Voraussetzung der linearen Zunahme der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit v_{max} mit der Enzymmenge bei gesättigtem Substratangebot wurde bereits bei Hoensch (29) überprüft.

So kann man also mittels Schnitt der Geraden, die sich ohne Hemmstoffzusatz ergibt, mit der Abszisse bzw. der Ordinate die Michaelis-Konstante K_m bzw. v_{max} für das Enzym EOD bestimmen, die in Tab. 7 für die drei Patienten aufgeführt sind. Im Gegensatz zur Ratte (s. 3.2.) ergibt sich also beim Mensch nur <u>ein</u> K_m-Wert für das Enzym EOD, das also nur aus <u>einer</u> Cyt P-450-abhängigen Monooxygenase besteht. Bei Pat. I ergibt sich ein höherer K_m-Wert, also

eine geringere Affinität des Substrats zum Enzym, was für eine Veränderung des Enzyms spricht.
Bei der Hemmung ergeben sich graphisch bei Cimetidin steilere Geraden als bei Ranitidin mit entsprechender Konzentration. Dies zeigt also schon qualitativ eine stärkere Hemmung der EOD mit Cimetidin als mit Ranitidin. Quantitativ läßt sich mittels der Sekundärdiagramme (s. 1.6.6.) in Abb. 3 für Pat. I, in Abb. 6 für Pat. II und in Abb. 9 für Pat. III die K_i-Werte für Cimetidin und Ranitidin bestimmen, die ebenfalls in Tab. 7 aufgeführt sind. Die durchweg höheren $K_{i,ran}$-Werte zeigen eine geringere Affinität von Ranitidin zum Enzym EOD an, und damit indirekt auch eine geringere Hemmwirkung.

In Tab. 4 und 5 wird die Hemmung der 7-EC-Umsetzung mit Cimetidin und Ranitidin bei der jeweiligen Substratkonzentration prozentual angegeben.
Über die Art der Hemmwirkung und damit auch über den Angriffsort der Hemmstoffe läßt sich mittels dieser EOD-Kinetiken keine eindeutige Aussage machen, da weder ein genauer Schnittpunkt aller Geraden auf der Abszisse oder auf der Ordinate, noch eine Parallelenschar zu ermitteln ist.

3.4. Die Reduktionsrate von Cyt c mit Lebermikrosomen beim Menschen

Bei einer gesättigten Cyt c,ox.-Konzentration von 4,8 x 10^{-5}M in der Küvette ergibt sich bei Pat. IV eine spezifische Reduktase-Aktivität von 144 nM/min/mg Prot mit einem K_m-Wert von 1,2 x 10^{-5}M. Die reziproken Meßwerte der 'Reduktase'-Kinetik mit Hemmung werden in Tab. 2 dargestellt. Die Werte sind als Lineweaver-Burk-Diagramm in Abb. 10 und 11 aufgezeichnet und ebenfalls mit Regressionsgeraden verbunden.

Auch hier zeigt sich durch eine gute Regression die Gültigkeit der Michaelis-Menten-Gleichung für die NADPH-Cyt c-Reduktase beim Menschen. K_m und v_{max} sind in Tab. 7 aufgeführt. Bei Zusatz von Cimetidin und Ranitidin ergeben sich kaum Unterschiede in der Steigung der Geraden. Bei Ranitidin haben sie praktisch alle identische Steigungen, trotz viel höher eingesetzter Ranitidin-Konzentration als bei der EOD-Kinetik, und bei Cimetidin verläuft auch nur die Gerade mit der höchsten Konzentration etwas steiler. Ebenso ergibt sich im Sekundärdiagramm der Abb. 12 für Ranitidin rechnerisch ein so hoher K_i-Wert (Tab. 7), daß man davon ausgehen kann, daß Ranitidin die NADPH-Cyt c-Reduktase nicht hemmt. Cimetidin hat im Vergleich dazu einen geringeren K_i-Wert (Tab. 7), der aber um einiges größer ist, als die $K_{i,cim}$-Werte bei der EOD-Bestimmung, was auch bei Cimetidin, wenn überhaupt vorhanden, auf eine sehr geringe Hemmung der 'Reduktase' hinweist.

In Tab. 6 ist der Einfluß von Cimetidin und Ranitidin auf die 'Reduktase' noch prozentual angegeben, und es zeigt sich durch + und -Werte eine Streuung der Werte um die Nullinie herum.

3.5. Bindungsspektren von Cimetidin und Ranitidin

Abb. 14 zeigt die spektralen Veränderungen bei Bindung von Cimetidin bzw. Ranitidin an Lebermikrosomen von Pat. V bzw. VI. Cimetidin zeigt dabei ein klassisches Typ II-Bindungsspektrum (s. 2.2.6.) mit einem Wellental bei 392 nm und einem Wellenberg bei 428 nm.

Das Spektrum mit Ranitidin läßt sich weder dem Typ I, II, noch dem 'reverse Typ' zuordnen, zeigt aber dennoch eine reproduzierbare spektrale Veränderung, die mit seitherigen Bindungsmodellen nicht erklärt werden kann und deswegen keine Aussage über eine etwaige Bindung an Lebermikrosomen gestattet.

3.6. Abbildungen und Tabellen

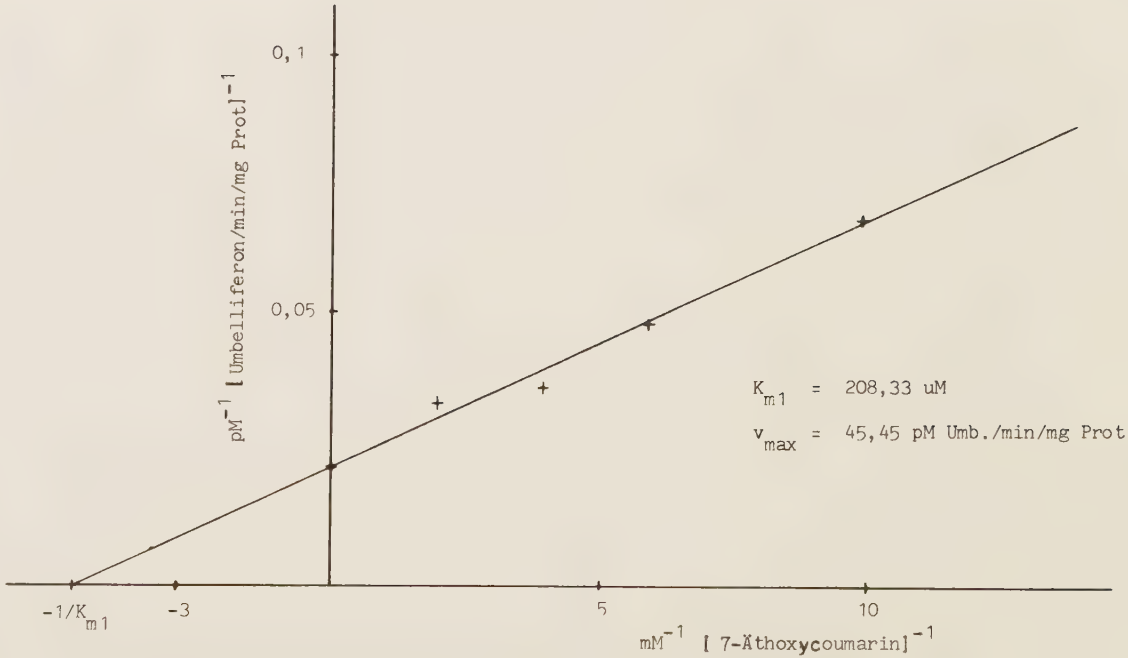


Abb. 0: Lineweaver-Burk Darstellung: Kinetik der 7-Äthoxycoumarin-O-Deäthylase bei der Ratte

r=0,99
Substratkonzentration von 5 x 10^{-4}M bis 1 x 10^{-4}M
Bei niedrigerer Substratkonzentration ergibt sich ein K_{m2} von 19,16 uM (nicht dargestellt)

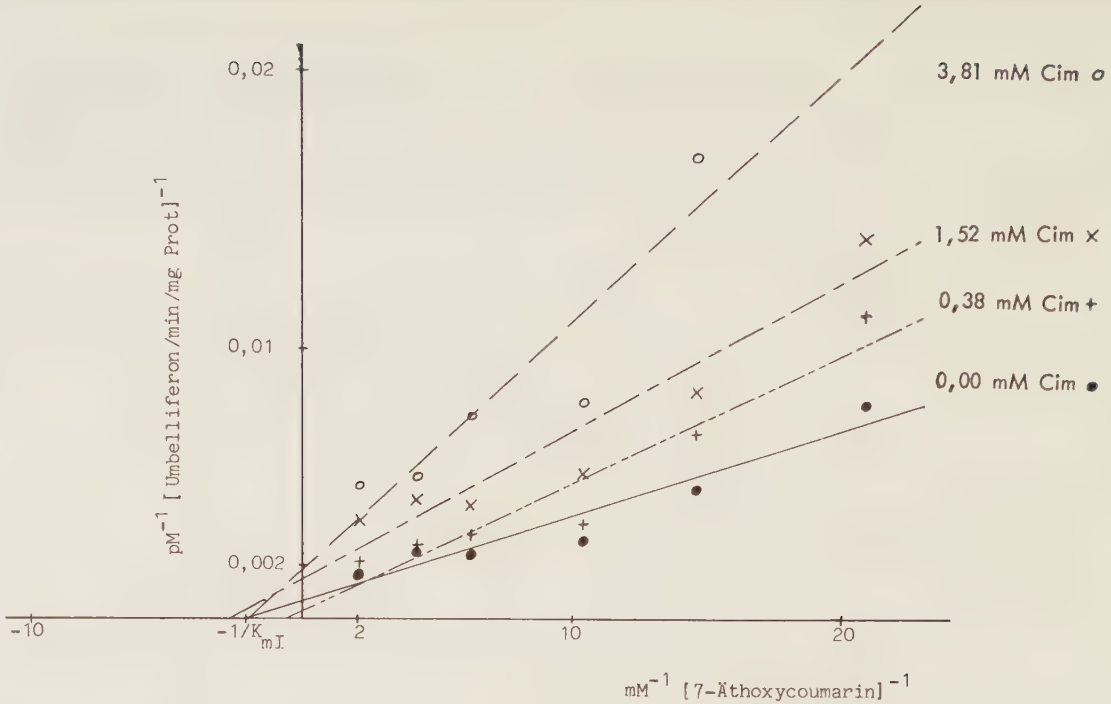


Abb. 1: Lineweaver-Burk Darstellung: Hemmung der O-Dealkylierung von 7-Äthoxycoumarin durch Cimetidin

Material: Lebermikrosomen von Patient I
Kontrolle ohne Hemmstoff (r=0,96)
Cimetidinkonzentration in der Küvette: 0,38 mM (r=0,96); 1,52 mM (r=0,95); 3,81 mM (r=0,91)
Substratkonzentration in der Küvette: von $4{,}8 \times 10^{-4}$ M bis $4{,}8 \times 10^{-5}$ M

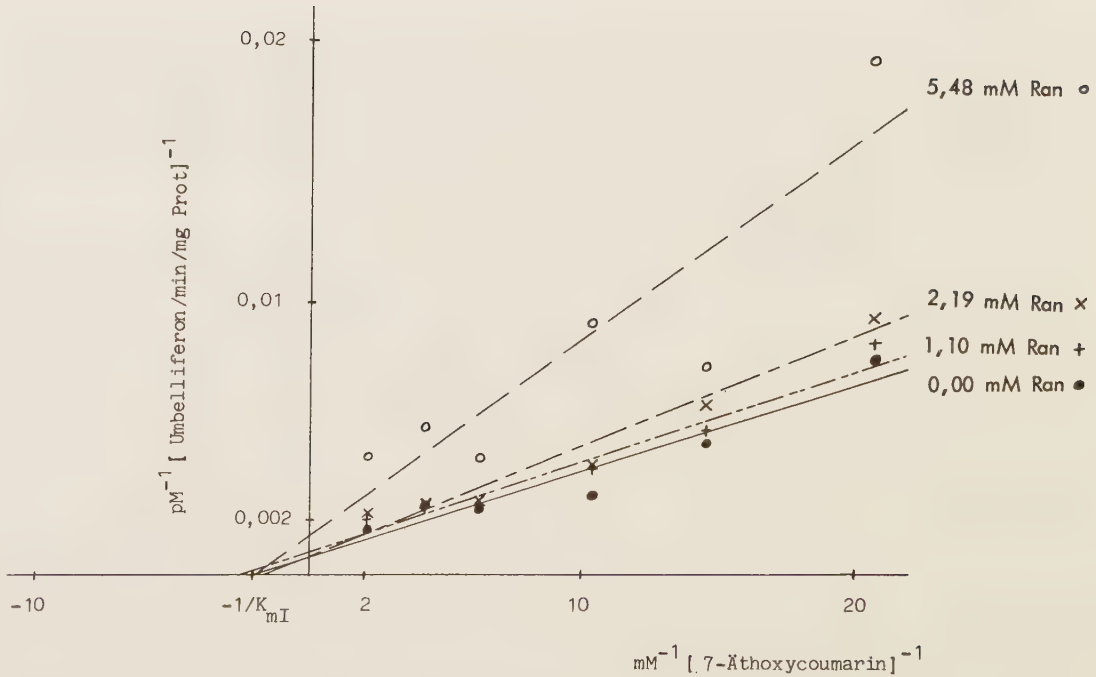


Abb. 2: Lineweaver-Burk Darstellung: Hemmung der O-Dealkylierung von 7-Äthoxycoumarin durch Ranitidin

Material: Lebermikrosomen von Patient I
Kontrolle ohne Hemmstoff (r=0,96)
Ranitidinkonzentration in der Küvette: 1,10 mM (r=0,98); 2,19 mM (r=0,98); 5,48 mM (r=0,90)
Substratkonzentration in der Küvette: von $4{,}8 \times 10^{-4}$ M bis $4{,}8 \times 10^{-5}$ M

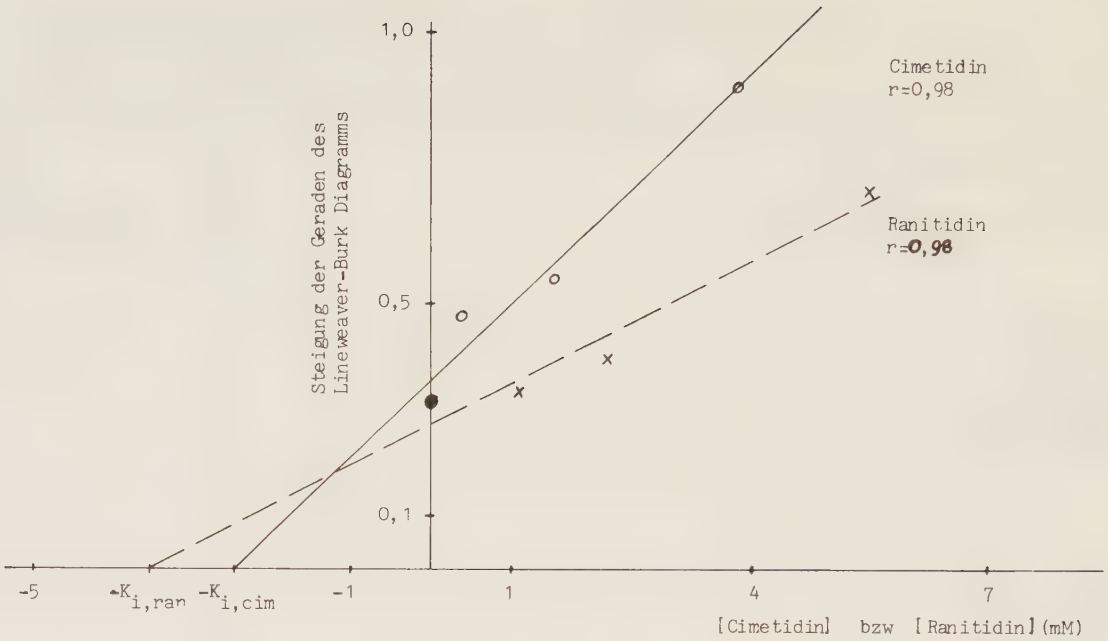


Abb. 3: Abhängigkeit der Steigung der Geraden des Lineweaver-Burk Diagramms von der Hemmstoffkonzentration
Sekundärdiagramm zur Bestimmung der Inhibitionskonstanten von Cim ($K_{i,cim}$) und Ran ($K_{i,ran}$)
für EOD
Material: Lebermikrosomen von Patient I
Hemmstoffkonzentrationen einschließl. Kontrollwerte s. Abb. 1 und 2

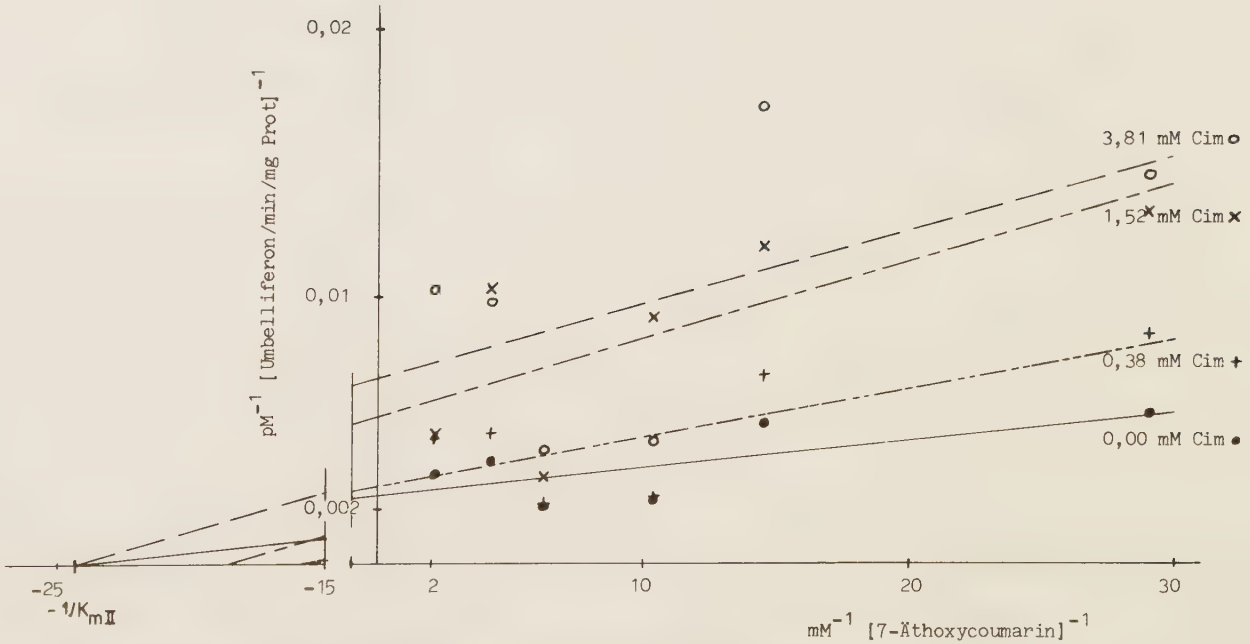


Abb. 4: Lineweaver-Burk Darstellung: Hemmung der O-Dealkylierung von 7-Äthoxycoumarin durch Cimetidin

Material: Lebermikrosomen von Patient II
Kontrolle ohne Hemmstoff (r=0,71)
Cimetidinkonzentration in der Küvette: 0,38 mM (r=0,73); 1,52 mM (r=0,73); 3,81 mM (r=0,54)
Substratkonzentration in der Küvette: von 4,8 x 10^{-4} M bis 3,4 x 10^{-5} M

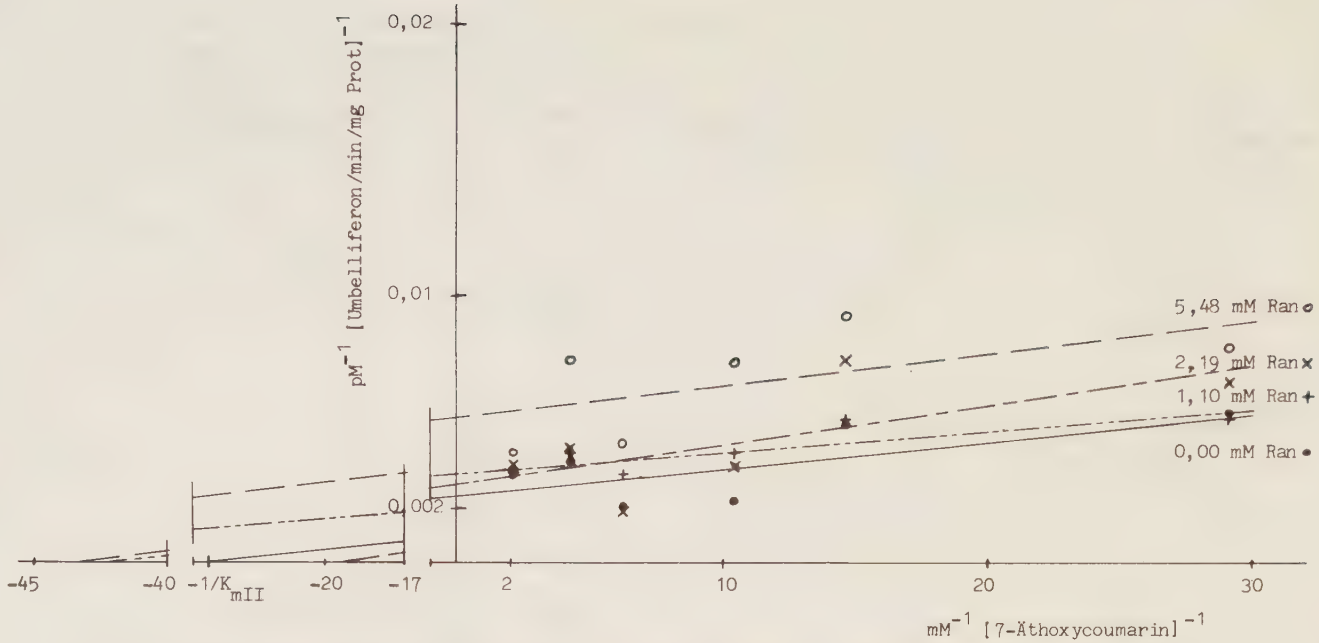


Abb. 5: Lineweaver-Burk Darstellung: Hemmung der O-Dealkylierung von 7-Äthoxycoumarin durch Ranitidin

Material: Lebermikrosomen von Patient II
Kontrolle ohne Hemmstoff (r=0,71)
Ranitidinkonzentration in der Küvette: 1,10 mM (r=0,83); 2,19 mM (r=0,70); 5,48 mM (r=0,60)
Substratkonzentration in der Küvette: von 4,8 x 10^{-4}M bis 3,4 x 10^{-5}M

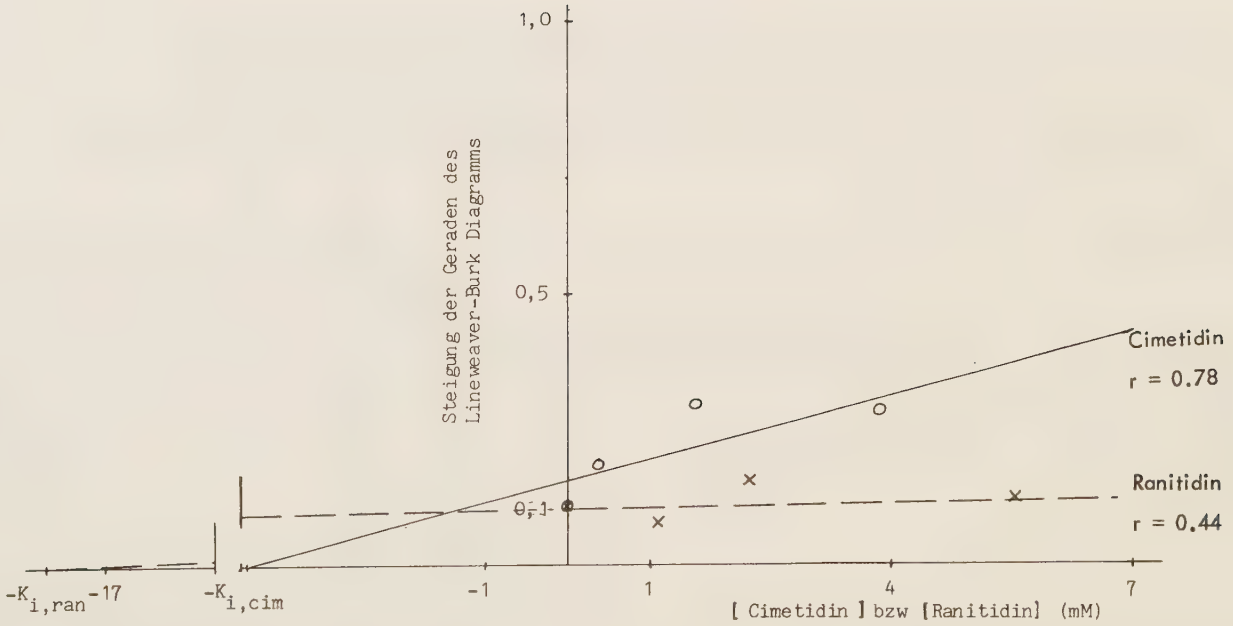


Abb. 6: Abhängigkeit der Steigung der Geraden des Lineweaver-Burk Diagramms von der Hemmstoffkonzentration
Sekundärdiagramm zur Bestimmung der Inhibitionskonstanten von Cim ($K_{i,cim}$) und Ran ($K_{i,ran}$)
für EOD

Material: Lebermikrosomen von Patient II

Hemmstoffkonzentrationen einschließl. Kontrollwerte s. Abb. 4 und 5

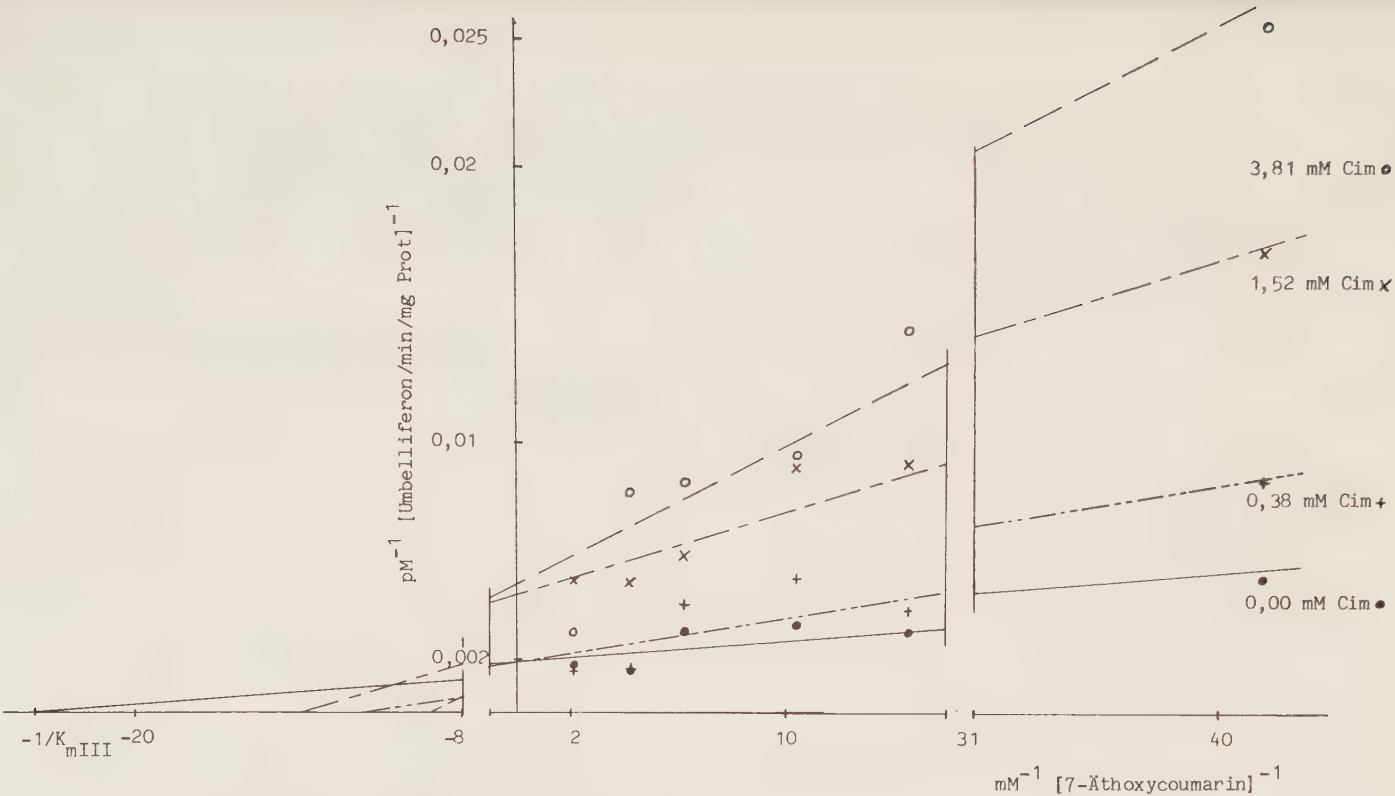


Abb. 7: Lineweaver-Burk Darstellung: Hemmung der O-Dealkylierung von 7-Äthoxycoumarin durch Cimetidin

Material: Lebermikrosomen von Patient III
Kontrolle ohne Hemmstoff (r=0,91)
Cimetidinkonzentration in der Küvette: 0,38 mM (r=0,92); 1,52 mM (r=0,98); 3,81 mM (r=0,97)
Substratkonzentration in der Küvette: von $4{,}8 \times 10^{-4}$ M bis $2{,}4 \times 10^{-5}$ M

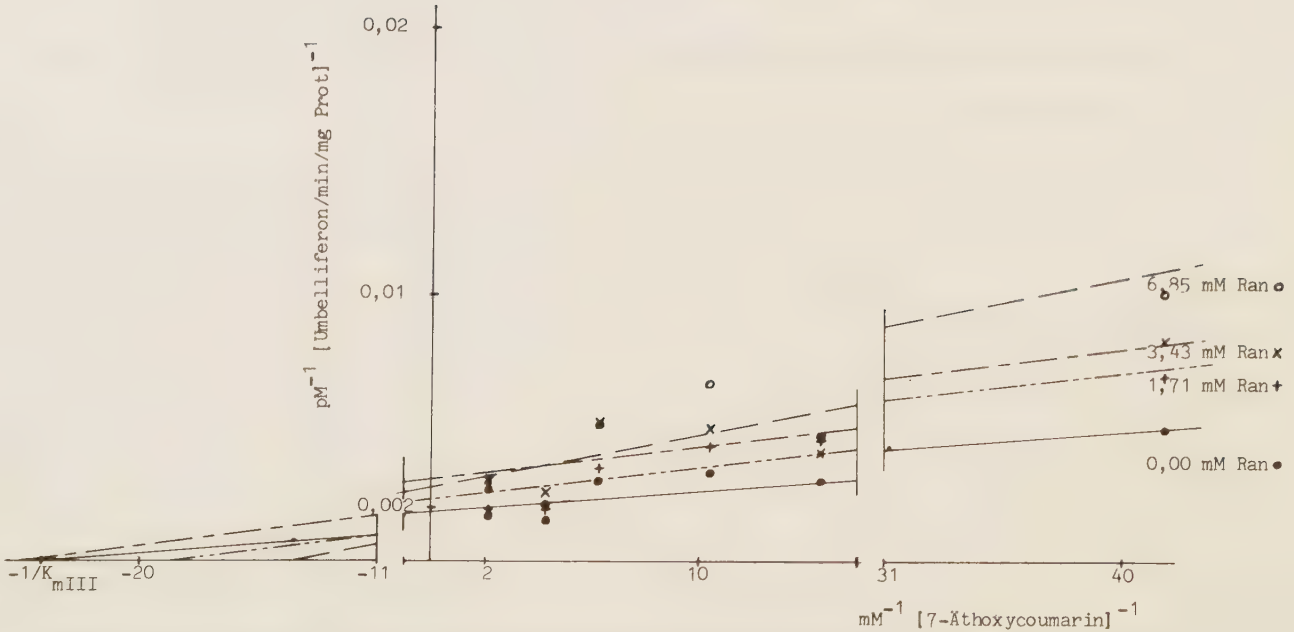


Abb. 8: Lineweaver-Burk Darstellung: Hemmung der O-Dealkylierung von 7-Äthoxycoumarin durch Ranitidin

Material: Lebermikrosomen von Patient III
Kontrolle ohne Hemmstoff (r=0,91)
Ranitidinkonzentration in der Küvette: 1,71 mM (r=0,93); 3,43 mM (r=0,90); 6,85 mM (r=0,91)
Substratkonzentration in der Küvette: von 4,8 x 10^{-4} M bis 2,4 x 10^{-5} M

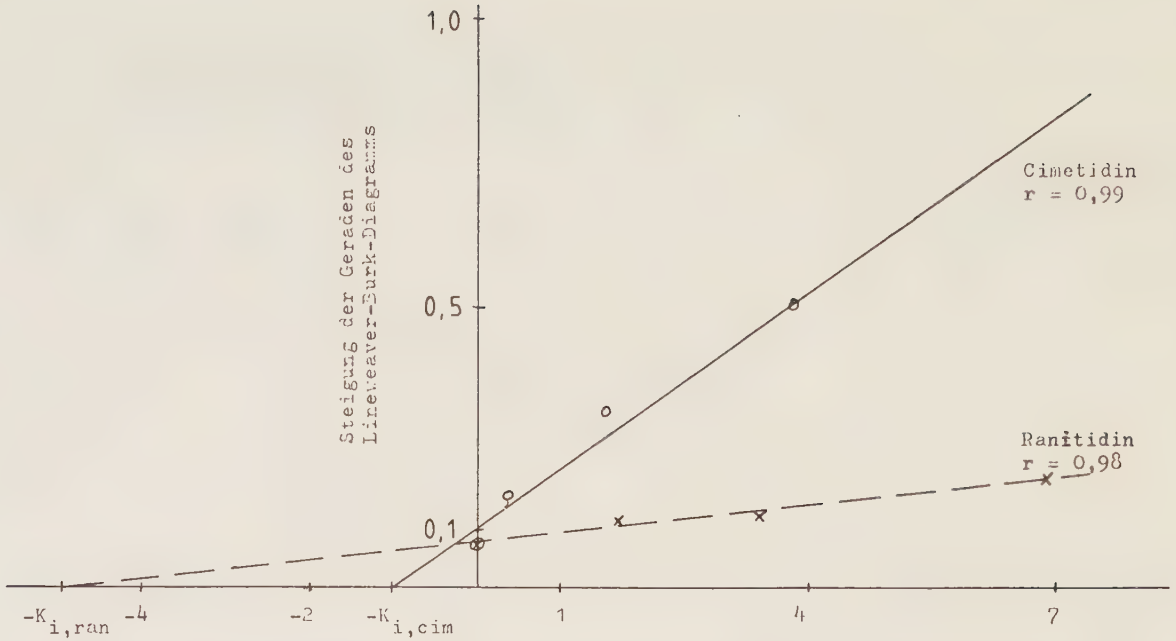


Abb.9: Abhängigkeit der Steigung der Geraden des Lineweaver-Burk-Diagramms von der Hemmstoffkonzentration. Sekundärdiagramm zur Bestimmung der Inhibitionskonstanten von Cim ($K_{i,cim}$) und Ran ($K_{i,ran}$) für EOD.
Material: Lebermikrosomen von Patient III
Hemmstoffkonzentrationen einschließl. Kontrollwerte s. Abb. 7 und 8

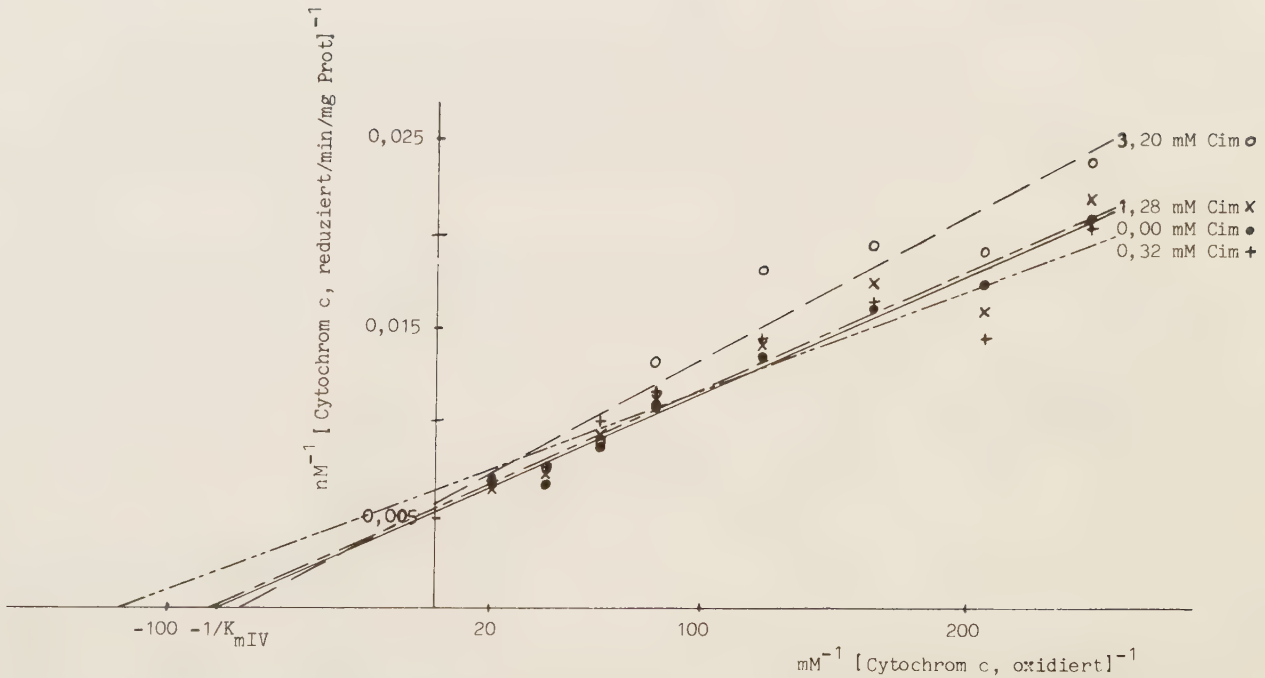


Abb.10: Lineweaver-Burk Darstellung: Einfluß von Cimetidin auf die NADPH-Cytochrom c-Reductase-Reaktion

Material: Lebermikrosomen von Patient IV
Kontrolle ohne Cimetidin (r=0,99)
Cimetidinkonzentration in der Küvette: 0,32 mM (r=0,95); 1,28 mM (r=0,97); 3,20 mM (r=0,96)
Substratkonzentration in der Küvette: von 4,8 x 10^{-3}M bis 4,0 x 10^{-6}M

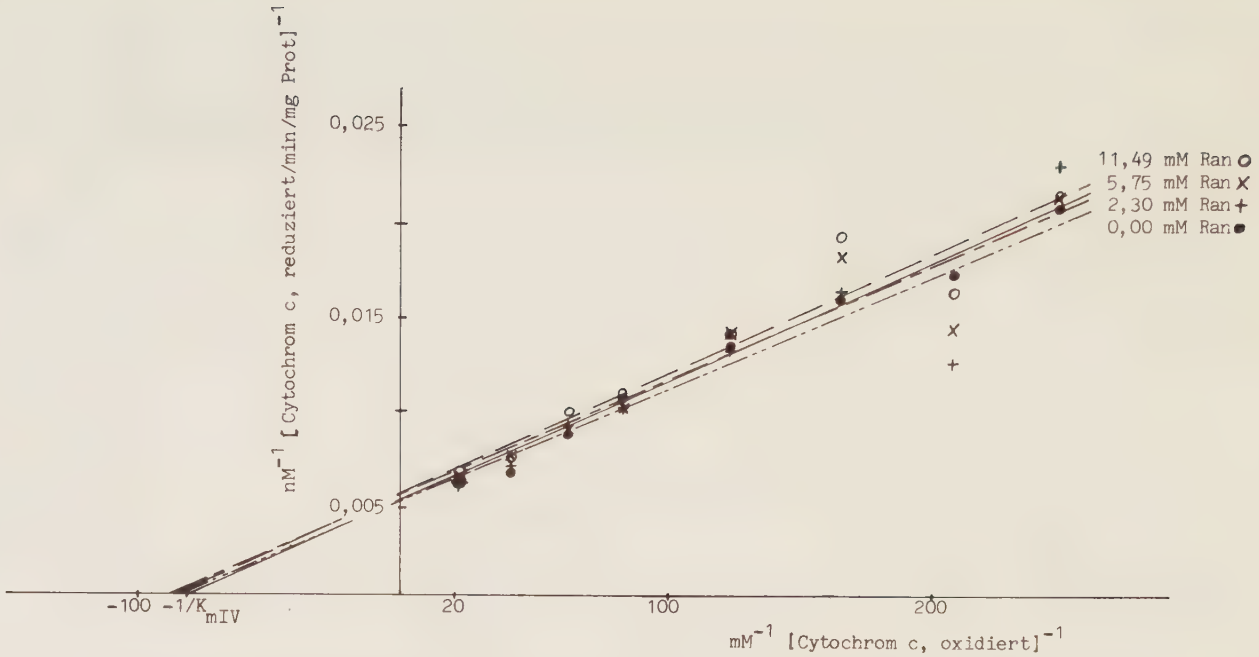


Abb.11: Lineweaver-Burk Darstellung: Einfluß von Ranitidin auf die NADPH-Cytochrom c-Reductase-Reaktion

Material: Lebermikrosomen von Patient IV
Kontrolle ohne Ranitidin (r=0,99)
Ranitidinkonzentration in der Küvette: 2,30 mM (r=0,87); 5,75 mM (r=0,94); 11,49 mM (r=0,96)
Substratkonzentration in der Küvette: von $4{,}9 \times 10^{-5}$ M bis $4{,}0 \times 10^{-6}$ M

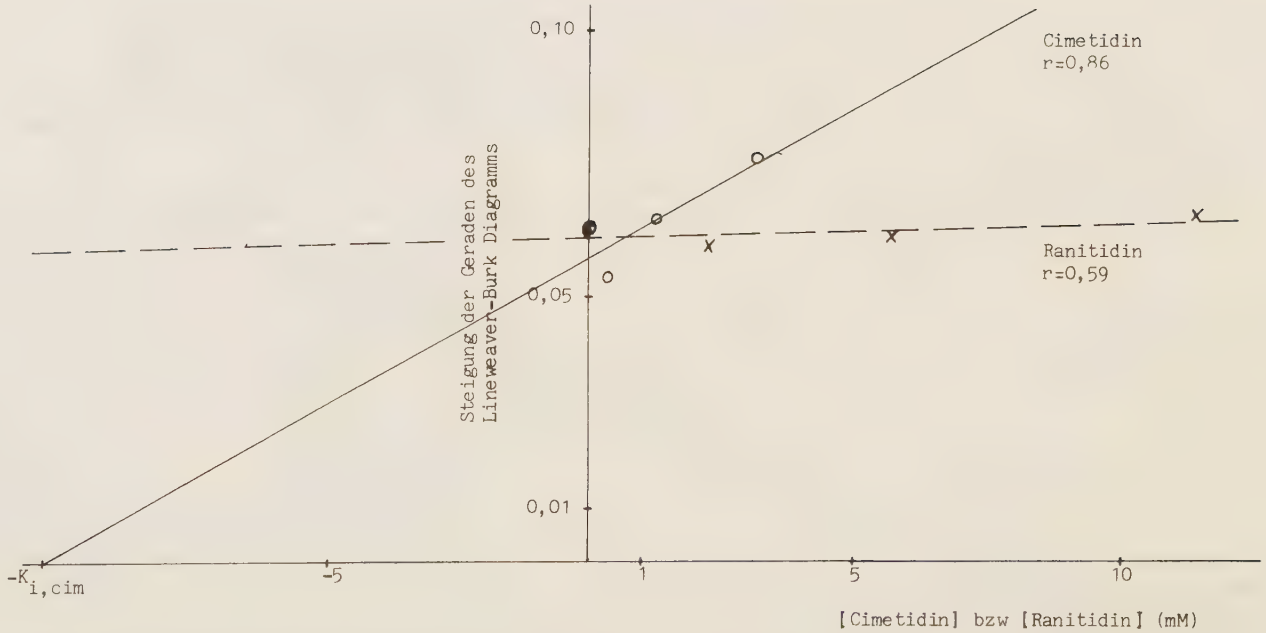


Abb.12: Abhängigkeit der Steigung der Geraden des Lineweaver-Burk Diagramms von der "Hemmstoff"konzentration Sekundärdiagramm zur Bestimmung der Inhibitionskonstanten von Cim ($K_{i,cim}$) und Ran ($K_{i,ran}$) für NADPH-Cytochrom c-Reductase-Reaktion

Material: Lebermikrosomen von Patient IV
"Hemmstoff"konzentrationen einschließl. Kontrollwerte s. Abb.10 und 11

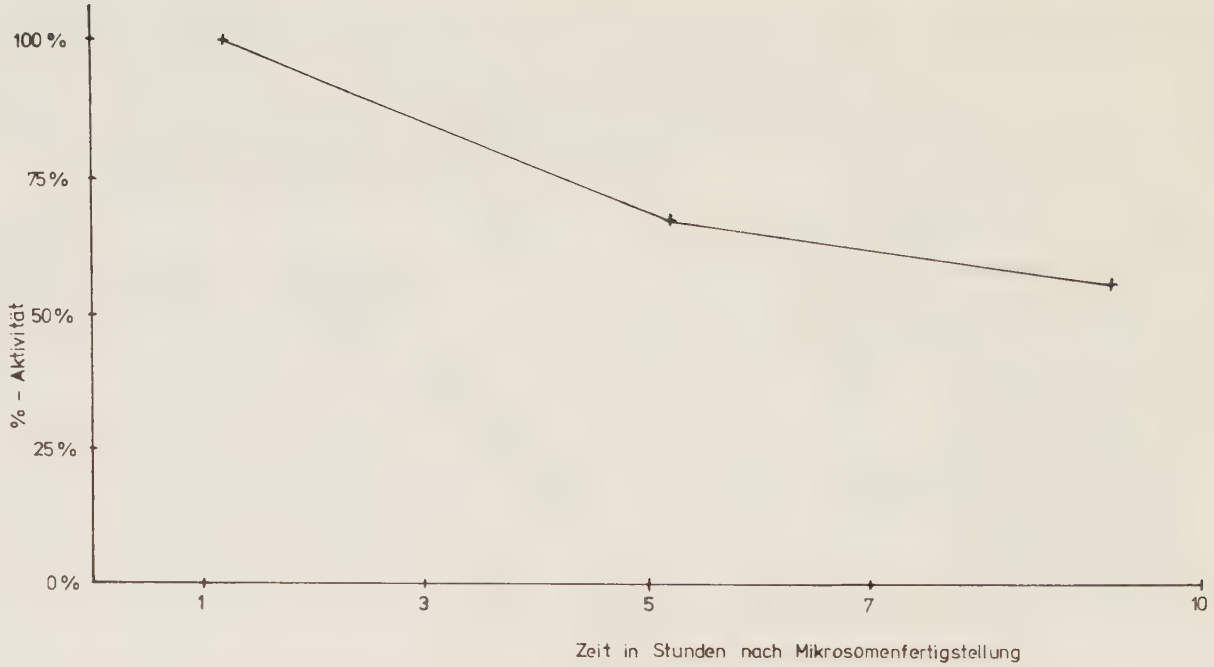


Abb.13: Prozentualer Aktivitätsverlust der 7-Äthoxycoumarin-O-Deäthylase in Abhängigkeit von der Zeit

Kurve repräsentativ für eine Kurvenschar mit verschiedenen Substratkonzentrationen
Material: Lebermikrosomen von Patient I
100% = 1.Wert nach Mikrosomenfertigstellung

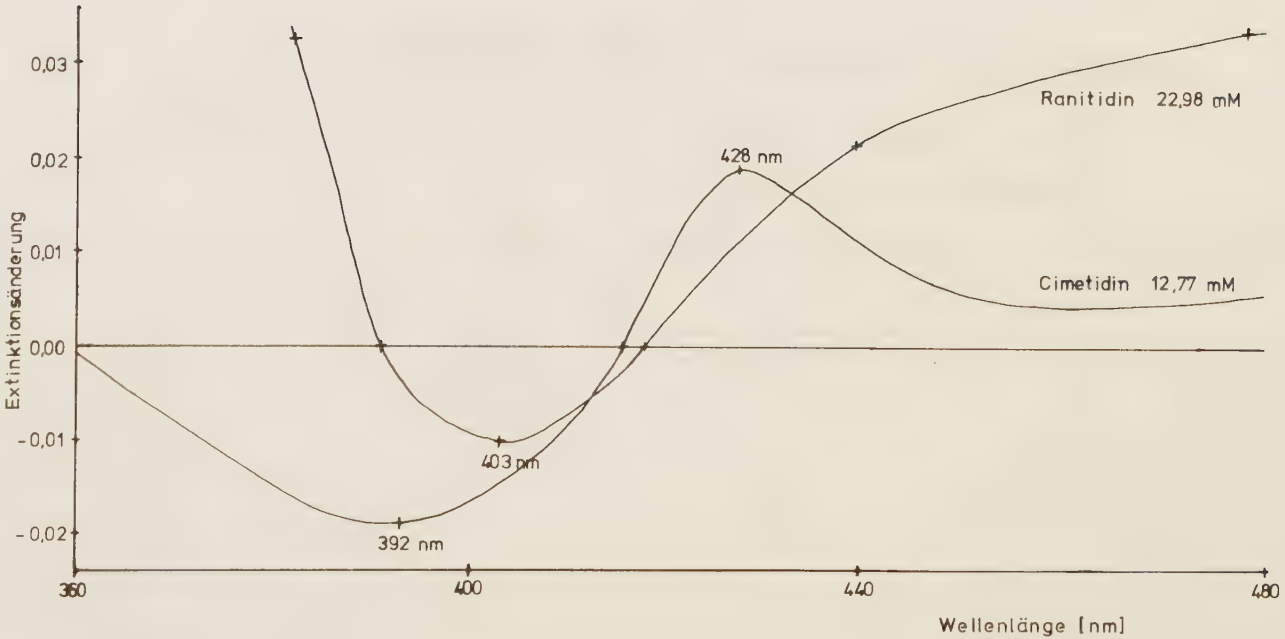


Abb.14: Bindungsspektren für Cimetidin und Ranitidin

Material: bei Cimetidin: Lebermikrosomen von Patient V
Proteingehalt der Küvette: 2,075 mg Prot/ml
bei Ranitidin: Lebermikrosomen von Patient VI
Proteingehalt der Küvette: 3,125 mg Prot/ml

Tab. 1: Produktion von Umbelliferon/min/mg Prot in Abhängigkeit vom Substrat- und Hemmstoffangebot
Meßwerte in reziproker Darstellung

Patient	1/7-EC mM^{-1}	pM^{-1} Umbelliferon/min/mg Prot						
		Kontrolle mit Lsgsmittel	Cimetidin			Ranitidin		
			0,38 mM	1,52 mM	3,81 mM	1,10 mM	2,19 mM	5,48 mM
I	2,1	0,0017	0,0021	0,0037	0,0049	0,0020	0,0022	0,0043
	4,2	0,0025	0,0027	0,0045	0,0053	0,0025	0,0025	0,0054
	6,2	0,0024	0,0031	0,0042	0,0075	0,0026	0,0028	0,0044
	10,4	0,0029	0,0035	0,0055	0,0081	0,0039	0,0041	0,0093
	14,6	0,0048	0,0068	0,0086	0,0172	0,0052	0,0063	0,0077
	20,8	0,0079	0,0112	0,0141	------	0,0085	0,0095	0,0191
II	2,1	0,0033	0,0047	0,0048	0,0103	0,0033	0,0036	0,0041
	4,2	0,0038	0,0048	0,0103	0,0098	0,0041	0,0043	0,0076
	6,2	0,0021	0,0021	0,0032	0,0042	0,0033	0,0019	0,0045
	10,4	0,0023	0,0024	0,0092	0,0045	0,0041	0,0036	0,0075
	14,6	0,0052	0,0070	0,0119	0,0172	0,0054	0,0076	0,0093
	29,1	0,0056	0,0086	0,0133	0,0146	0,0054	0,0068	0,0081

Tab. 1: Fortsetzung

Patient	1/7-EC mM^{-1}	pM^{-1} Umbelliferon / min / mg Prot						
		Kontrolle mit Lsgsmittel	Cimetidin			Ranitidin		
			0,38 mM	1,52 mM	3,81 mM	1,71 mM	3,43 mM	6,85 mM
	2,1	0,0016	0,0016	0,0048	0,0029	0,0019	0,0031	0,0027
	4,2	0,0015	0,0015	0,0048	0,0081	0,0019	0,0026	0,0021
III	6,2	0,0030	0,0040	0,0058	0,0085	0,0035	0,0052	0,0052
	10,4	0,0032	0,0049	0,0091	0,0095	0,0043	0,0050	0,0066
	14,6	0,0029	0,0038	0,0092	0,0142	0,0045	0,0040	0,0047
	41,6	0,0049	0,0085	0,0170	0,0252	0,0069	0,0083	0,0107

Tab. 2: Produktion von reduziertem Cytochrom c in Abhängigkeit vom Substrat- und Hemmstoffangebot
Meßwerte in reziproker Darstellung

Patient	1/Cyt c, oxidiert mM^{-1}	nM^{-1} Cytochrom c, reduziert/min/mg Prot						
		Kontrolle mit Lsgsmittel	Cimetidin			Ranitidin		
			0,32 mM	1,28 mM	3,20 mM	2,30 mM	5,75 mM	11,49 mM
IV	20,7	0,0069	0,0069	0,0066	0,0068	0,0062	0,0067	0,0065
	41,3	0,0068	0,0075	0,0072	0,0075	0,0070	0,0076	0,0076
	62,0	0,0087	0,0101	0,0093	0,0088	0,0092	0,0091	0,0100
	82,7	0,0108	0,0116	0,0113	0,0133	0,0101	0,0101	0,0110
	123,2	0,0137	0,0143	0,0142	0,0182	0,0134	0,0143	0,0142
	165,3	0,0161	0,0164	0,0176	0,0196	0,0166	0,0184	0,0196
	206,6	0,0173	0,0145	0,0160	0,0194	0,0112	0,0146	0,0164
	248,0	0,0210	0,0205	0,0222	0,0240	0,0233	0,0217	0,0218

Tab. 3: Patientendaten

+nur Thiopental als Leberenzyminduzierendes Medikament aufgeführt. Sonst übliche Narkosemittel verwendet.

Patient	Geschl.	Alter	Diagnose	OP-Vorgehen	Narkose: Thiopental+	Leberhistol.	erhöhte Leberwerte (d=Tag vor OP) IE/l	Alkohol/ Nikotin/ d	Medikamente/d	Bemerkungen
I=H.K.	w.	66,5J.	Duod.stenose durch lokalet. Metast.,Corp. uteri-Ca	Dd-Teilresektion + Duod. jejunostomie	0,25g	nicht erhoben jedoch keine Metastase palp.	1d: GOT 30 GPT 108 γGT 97 jedoch 10d: o.B.	neg./neg.	Elfanex 1 Ildamen 2 Allopurinol 1	Z.n. Cholecystektomie
II=M.K.	w.	50 J.	Cholecystolithiasis Schrumpfgallenblase	Cholecystektomie	0,25g	unauffällig	4d: GOT 26 GPT 30 γGT 177 AP 284	neg./neg.	Abführmittel	
III=K.H.	w.	64,5J.	Cholecystolithiasis	Cholecystektomie	nein	schwere Fettleber, Lochkerne s. D.m.	2d: nur γGT 26	?	Lanitop 1,5 Briserin 1	D.m. ohne Medikamente Adipositas
IV=H.B.	m.	73,7J.	Cholecystolithiasis	Cholecystektomie	0,25g	leichte Fettleber	1d: o.B.	1Fl. Bier 1/4l Wein Nic. neg	Abführmittel Lanitop Briserin 1 Honvan	Prostata-Ca
V=J.S.	m.	75 J.	Stenos.inop. Cardia-Ca	Einlage Häring-Tubus	nein	sichtb.Metast. jedoch nicht im untersuchten Präparat	6d: o.B.	neg./neg.	Digoxin 1 Limbatril 1/3 Segontin 1	Adipositas
VI=S.R.	w.	21,7J.	Cholecystolithiasis	Cholecystektomie	0,2 g	unauffällig	1d: GPT 36 γGT 147 AP 264	?	Spasmolytica Analgetica	mäßige Adipositas

Tab. 4 : Prozentuale Hemmung der Produktion von Umbelliferon mit verschiedenen CIMETIDINkonzentrationen bei der jeweiligen Substratkonzentration
abgelesen s. Abb. 1 , 4 , 7 für Patient I-III

Cimetidin mM	Patient	mM 7 - Äthoxycoumarin							
		0,481	0,240	0,160	0,096	0,069	0,048	0,034	0,024
0,38	I	0%	17,4%	24,3%	29,6%	31,1%	32,7%	-----	-----
	II	15,6%	19,5%	22,5%	25,0%	27,3%	-----	32,9%	-----
	III	9,1%	12,0%	20,7%	25,0%	28,6%	-----	-----	38,4%
1,52	I	51,9%	51,3%	51,0%	48,7%	48,0%	47,4%	-----	-----
	II	55,7%	56,7%	57,5%	57,7%	58,8%	-----	60,7%	-----
	III	59,2%	60,7%	62,9%	64,0%	65,9%	-----	-----	69,2%
3,81	I	64,9%	66,7%	66,7%	66,7%	66,7%	66,7%	-----	-----
	II	64,0%	64,2%	64,0%	63,3%	63,6%	-----	63,3%	-----
	III	65,5%	67,7%	70,9%	73,0%	75,4%	-----	-----	79,8%

Tab. 5: Prozentuale Hemmung der Produktion von Umbelliferon mit verschiedenen RANITIDIN konzentrationen bei der jeweiligen Substratkonzentration
abgelesen s. Abb. 2 , 5 , 8 für Patient I-III

Ranitidin mM	Patient	mM 7-Äthoxycoumarin							
		0,481	0,240	0,160	0,096	0,069	0,048	0,034	0,024
1,10	I	13,3%	13,1%	6,9%	6,8%	6,9%	5,1%	-----	-----
	II	22,9%	21,6%	18,4%	14,3%	11,1%	-----	5,3%	-----
1,71	III	20,0%	21,4%	23,3%	25,7%	27,5%	-----	-----	30,6%
2,19	I	13,3%	16,7%	15,6%	14,6%	18,2%	16,7%	-----	-----
	II	18,2%	19,5%	18,4%	20,0%	23,1%	-----	26,0%	-----
3,43	III	39,4%	38,9%	39,5%	39,5%	39,6%	-----	-----	39,0%
5,48	I	55,2%	55,6%	54,2%	54,5%	55,0%	54,6%	-----	-----
	II	52,6%	51,7%	50,0%	46,3%	44,5%	-----	40,0%	-----
6,85	III	37,5%	38,9%	42,5%	45,8%	48,2%	-----	-----	54,1%

Tab. 6 : Prozentuale Änderung der Produktion von reduziertem Cytochrom c mit verschiedenen Hemmstoffkonzentrationen bei der jeweiligen Substratkonzentration abgelesen s. Abb. 10 , 11 für Patient IV

-% = Hemmung ; +% = Aktivierung

Hemmstoff mM		mM Cytochrom c, oxidiert							
		0,048	0,024	0,016	0,012	0,008	0,006	0,005	0,004
Cim	0,32	-13,5%	-9,3%	-5,7%	-3,3%	+0,4%	+3,0%	+5,2%	+6,7%
	1,28	-5,2%	-3,7%	-3,7%	-3,3%	-3,4%	-3,1%	-2,9%	-2,8%
	3,20	-11,1%	-11,4%	-12,1%	-13,0%	-14,0	-14,8%	-15,0%	-15,3%
Ran	2,30	+2,4%	+3,3%	+3,4%	+4,0%	+3,6%	+4,0%	+4,0%	+4,0%
	5,75	-3,8%	-2,5%	-0,6%	±0,0%	±0,0%	+0,6%	+1,1%	-16,8%
	11,49	-7,9%	-6,6%	-5,7%	-5,5%	-4,8%	-4,6%	-4,2%	-4,2%

Tab. 7: Michaelis-Konstante (K_m), maximale Reaktionsgeschwindigkeit (v_{max}), Inhibitionskonstante für Cimetidin ($K_{i,cim}$) und Ranitidin ($K_{i,ran}$) als Charakteristika der beiden Enzyme EOD und Reduktase +

	E C D			Reduktase
	Patient I	Patient II	Patient III	Patient IV
K_m (µM)	478,01	40,92	42,19	12,21
v_{max} (nM/min/mg Prot)	1,52	0,39	0,54	193,05
$K_{i,cim}$ (mM)	2,49	3,94	1,01	10,23
$K_{i,ran}$ (mM)	3,57	17,70	4,96	225,24

+ EOD = 7-Äthoxycoumarin-O-Deäthylase

Reduktase = NADPH-Cytochrom c-Reduktase

4. DISKUSSION

Schaut man die neueste Literatur nach Einsatz und Wirkungen von Cimetidin durch, so gibt es wohl kaum ein Gebiet, auf dem Cimetidin neben seiner bekannten Hauptwirkung auf das Abheilen eines Ulcus duodeni, im Zusammenhang mit anderen Krankheitsbildern, nicht erforscht und eine etwaige Wechselwirkung therapeutisch ausgenützt wird.

Nicht nur als therapeutische Anwendungen im Bereich des Magen-Darm-Traktes mit Ulcus, Streßulcera nach Operationen, akute Blutungen aus dem oberen Gastrointestinaltrakt, Zollinger-Ellison-Syndrom, Refluxösophagitis, Barrett-Ösophagus, Ménétrier-Syndrom, sondern auch im Zusammenhang mit Hautkrankheiten wie Akne, atopischer Dermatitis, Psoriasis mit PUVA-Behandlung, bei systemischen inneren Erkrankungen wie der Mastocytose, des Pruritus bei Polycythämia vera, bei endokrinen Erkrankungen wie Hirsutismus oder Hyperparathyreoidismus, bei akuter Pankreatitis, bei portaler Hypertension und bei Migräne wird Cimetidin durch seine H_2-Rezeptor blockierende Wirkung als wirksames Therapeutikum diskutiert. Auch in der Anästhesie scheint sich eine präoperative H_2-Rezeptorblockierung bei Fettsüchtigen, Notfallpatienten mit vollem Magen, bei allgemein abdominellen Eingriffen und bei Frauen vor der Entbindung als Prävention des Säure-Aspirations-Syndroms bzw. des Mendelson-Syndroms günstig auszuwirken (24).

Für diese breite Palette von Anwendungen eines H_2-Rezeptorenblockers braucht man neben seiner Wirksamkeit eine besonders niedrige Nebenwirkungsrate. In dieser Hinsicht wurde in letzter Zeit bei Cimetidin auf unerwünschte Wechselwirkungen mit dem Arzneimittelmetabolismus von Warfarin (70), Antipyrin (27, 37, 70), Diazepam, Desmethyldiazepam (36-38), Phenytoin, Theophyllin (86), Clomethiazol, Morphin (21) und Propranolol (20) beim Menschen hingewiesen. Dieser Mechanismus beruht auf einer in vitro nachgewiesenen (58, 59, 74)

Hemmwirkung von Cimetidin auf die Cyt P-450 abhängigen Monooxygenasereaktionen von Oxidation und Reduktion (= Phase I-Reaktionen), mit der diese Arzneimittel in der Leber abgebaut werden und dadurch ihre Wirkung verlieren können.

Neuerdings werden noch weitere Mechanismen zur Erklärung der erhöhten Plasmaspiegel dieser Medikamente bei gleichzeitiger Cimetidinbehandlung diskutiert, die in vivo zusätzlich auftreten, wie ein leicht vermindertes Verteilungsvolumen bei Warfarin (70) und Diazepam (36), nicht aber bei Antipyrin und Desmethyldiazepam. In gleichem Maße kann die Erkenntnis verwertet werden, daß H_1 - und H_2-Rezeptoren an der durch Histamin gesteigerten Durchblutung von Magen, Darm und Leber beteiligt sind, und Cimetidin als H_2-Rezeptorenblocker tatsächlich die Leberdurchblutung bei akuter Gabe um 25 %, bei chronischer Gabe um 33 % vermindert, was besonders die Clearance von Medikamenten mit hoher hepatischer Extraktionsrate wie Propranolol und Morphin vermindert (20). Diese Aussage ist jedoch besonders wegen der zugrunde liegenden Indocyaningrün-Methode zur Bestimmung der Leberdurchblutung umstritten, zumal elektromagnetische Flußproben bei Hunden die Veränderung der Leberdurchblutung nicht bestätigten (32).

Desgleichen fand man H_2-Rezeptoren im Gehirn, deren Stimulation eine Vasodilatation bewirkt, und man so möglicherweise die Verwirrtheitszustände bei älteren Patienten mit einer zerebralen Vasokonstriktion durch Cimetidin erklären könnte. Man fand jedoch nur eine altersbedingte und keine Cimetidin-induzierte Abnahme der zerebralen Durchblutung (26).

Im Hinblick auf diese potentielle Nebenwirkung von Cimetidin bei Behandlung mit anderen Medikamenten wurde Ranitidin als weiterer H_2-Rezeptorenblocker, der das Cimetidin in der Behandlung der Hypersekretionszustände des Magens auf molekularer Ebene sogar übertrifft (s. 1.4.), untersucht. Hier fanden sich nun im Gegensatz zu Cimetidin keine Beeinflussung

des menschlichen in vivo Metabolismus von Antipyrin und Aminopyrin (27, 76). Ebenso wird auch die Warfarinplasmakonzentration durch Ranitidin nicht verändert (71). Die Leberdurchblutung beim Menschen, gemessen mit der Indocyaningrün-Methode, wird durch Ranitidin nicht vermindert (25).

Im Gegensatz dazu beschreibt Speeg (75) bei der Ratte eine leichte Hemmung des Aminopyrinatmungstestes duch Ranitidin, die sehr viel geringer als bei Cimetidin ausfällt, und untersucht auch die in vitro Demethylation von Aminopyrin in Rattenlebermikrosomen und findet dabei für Cimetidin einen K_i-Wert von 0,13 mM, für Ranitidin einen K_i-Wert von 3,69 mM. In einer früheren Arbeit (74) gibt er für Cimetidin einen K_i-Wert von 1 mM und für Ranitidin 2,8 mM an. Dabei zeigt sich folgendes:

1. Die Ergebnisse von der Ratte sind nicht uneingeschränkt auf den Mensch zu übertragen.
2. Ranitidin zeigt bei der Ratte eine Hemmwirkung auf Lebermikrosomen, jedoch eine deutlich geringere als Cimetidin.
3. Der in vitro Test ist eine empfindlichere Methode zum Nachweis einer Enzymhemmung, die in vivo nicht so deutlich zum Tragen kommen braucht und damit beim Menschen eventuell klinisch irrelevant wird.

Daher wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluß von Cimetidin und Ranitidin auf eine Monooxygenase, die 7-Äthoxycoumarin-O-Deäthylase, in vitro und beim Menschen bestimmt.

Die EOD-Reaktion, bestimmt mit der Methode von Ullrich und Weber (80), eignet sich durch einen relativ einfachen Versuchsaufbau und durch einen sehr empfindlichen fluoreszenzspektroskopischen Nachweis von Umbelliferon bis 10-20 pMol/ml (80). Auch die Reproduzierbarkeit des Testes ist mit 10 % Variationskoeffizient (29) recht gut. Allerdings erschwert der relativ langsame Umsatz des 7-EC, dessen Produkt über 25 min konstant zunimmt und gemessen wird, die Erstellung einer Enzymkinetik,

wobei viele Meßpunkte unter gleichen Bedingungen, also gleiche Grundenzymaktivität, gewonnen werden sollten, was bei dem zeitlichen Abfall der Enzymaktivität der präparierten Mikrosomen, der durch die hohe Empfindlichkeit von Enzymproteinen bedingt ist (s. 3.1.), nicht ohne zeitliche Korrektur möglich ist. Durch die lange Enzymmessung wurde es auch nötig, die gesamte Kinetik mit Hemm-Bestimmungen auf drei Tage zu verteilen, wobei alle Hemmungen mit je zwei Substraten an einem Tag durchgeführt wurden, was sich wohl auch in den Regressionskoeffizienten etwas widerspiegelt.

Beim Vorversuch mit unbehandelten Rattenlebermikrosomen wurde im Gegensatz zu Ullrich (81) eine deutliche O-Desalkylierung von 7-Äthoxycoumarin gefunden. Bei der gesättigten 7-EC-Konzentration von $4{,}8 \times 10^{-4}$M in der Küvette ergab sich eine spezifische EOD-Aktivität von 300 pM/min/mg Prot. Die beiden Michaelis-Konstanten mit K_{m1} von $2{,}1 \times 10^{-4}$M und K_{m2} von $1{,}9 \times 10^{-5}$M zeigen eine mittelstarke Affinität von 7-EC zum Enzym.

Ullrich (81) beobachtet mit einer gesättigten Konzentration von 4×10^{-4}M 7-EC bei Phenobarbital bzw. 3-Methylcholanthren vorbehandelten Ratten eine spezifische Aktivität von 1500 pM/min/mg Prot bzw. 4000 pM/min/mg Prot. Diese Werte zeigen eine deutliche, unterschiedlich starke Induktion der spezifischen Aktivität von EOD, gleichermaßen sind auch die kinetischen Parameter zwischen Phenobarbital-, 3-Methylcholanthren und unbehandelten Ratten verschieden. Bei Phenobarbital vorbehandelten Ratten gibt Ullrich nur einen K_m-Wert von $2{,}7 \times 10^{-5}$M an, bei 3-Methylcholanthren vorbehandelten Ratten wie auch vorliegende Werte von unbehandelten Ratten zeigen, zwei K_m-Werte, allerdings mit $1{,}5 \times 10^{-6}$M und $2{,}5 \times 10^{-5}$M, also mit rund 10fach höheren Affinitätsraten als bei vorliegenden unbehandelten Ratten. Auf diese Unterschiede in den kinetischen Eigenschaften und unterschiedliche Auswirkung von Hemmstoffen auf induzierte Leberenzyme wird im Zusammenhang mit dem Vorhandensein verschiedener Formen von Cyt P-450 später eingegangen.

Beim Menschen ergeben sich bei der gleichen gesättigten 7-EC-Konzentration von $4{,}8 \times 10^{-4}$ M in der Küvette spezifische EOD-Aktivitäten von 586 pM/min/mg Prot bei Pat. I, 301 pM/min/mg Prot bei Pat. II und 610 pM/min/mg Prot bei Pat. III. Die Werte sind an der oberen Grenze verglichen mit den spezifischen Aktivitäten von $268{,}9 \pm 96{,}1$ pM/min/mg Prot, die Hoensch (31) bei seiner Kontrollgruppe mit normalen Leberwerten angibt. Die K_m-Werte liegen für Pat. II und III mit $4{,}1 \times 10^{-5}$ M und $4{,}2 \times 10^{-5}$ M in der gleichen Größenordnung wie der angegebene K_m-Wert von Hoensch mit 7×10^{-5} M (31). Genauso sind die v_{max}-Werte von Pat. II und III mit 0,39 und 0,54 nM/min/mg Prot miteinander vergleichbar. Dagegen zeigt Pat. I eine 10fach geringere Affinität vom Substrat zum Enzym mit einem K_m von $4{,}8 \times 10^{-4}$ M. Der v_{max}-Wert ist mit 1,52 nM/min/mg Prot rund 3fach höher als der der beiden anderen Patienten, zeigt also eine weit höhere Umsatzrate.

Die Diskrepanz zwischen der spezifischen Aktivität von 586 pM/min/mg Prot bei einer 7-EC-Konzentration von $4{,}8 \times 10^{-4}$ M und dem v_{max} von 1,52 nM/min/mg Prot, das ja die spezifische Aktivität bei unendlich großer Substratkonzentration angibt, läßt vermuten, daß bei Pat. I diese 7-EC-Konzentration noch nicht gesättigt ist. Da v_{max} eigentlich nur vom Gesamtenzymprotein abhängt (3) und zwar von der Menge an EOD-Enzymprotein, kann man zum einen bei Pat. I im Vergleich mit Tab. 3 annehmen, daß seine täglich eingenommenen Medikamente von Elfanex, Ildamen und Allopurinol das EOD-Enzym im Sinne einer Induktion beeinflußt haben. Andererseits ist damit noch nicht der unterschiedliche K_m-Wert mit der niedrigeren Affinität erklärt, der ja allein durch eine Enzyminduktion nicht verändert werden darf.

Hierzu muß man eine andere Erklärungsmöglichkeit hinzuziehen. Es gibt ja nicht nur zwischen Tier und Mensch bedeutende quantitative und qualitative Unterschiede im Biotransformationssystem, sondern auch zwischen den Menschen (s. 1.1.). Die große Variabilität bei der Arzneimittelmetabolisierung

beim Menschen in vivo und in vitro (19) ist vor allem genetisch determiniert, weiter spielen Alter, Geschlecht (männliche Ratten zeigen höhere Aktivitäten als weibliche) (81) und Hormone eine wichtige Rolle. Z.B. können Geschlechtshormone als natürliche Induktoren für das Cyt P-450 angesehen werden, von dem sie ja selbst umgesetzt werden, und dadurch die Umsetzung anderer Stoffe beeinflussen (19).

Vor allem durch Induktoren wie 3-Methylcholanthren und Phenobarbital fand man bei Ratten unterschiedliche Arten mit unterschiedlichen Eigenschaften des Cyt P-450 (19, 46). So induziert 3-Methylcholanthren vor allem das Cyt P-448, mit dem Absorptionsmaximum seines reduzierten CO-Differenzspektrums bei 448 nm, im Vergleich zu 450 nm bei der Phenobarbital induzierten Form von Cyt P-450. Diese beiden Typen weisen neben diesen spektralen Veränderungen große Unterschiede bei kinetischen Studien (s.o., unterschiedliche K_m bei gleichem Substrat), bei Molekulargewichtsbestimmungen (Cyt P-448 ist schwerer), bei immunologischen Antikörperstudien und in ihrer primären Aminosäuresequenz auf (46). So besteht 'Cyt P-450' aus mehreren Isoenzymen, die also die gleichen enzymatischen Reaktionen katalysieren, sich aber in ihrer Primärstruktur und den weiteren, oben genannten Eigenschaften unterscheiden und auch durch verschiedene Gene codiert werden (46). Wie viele verschiedene Arten von Cyt P-450 tatsächlich existieren ist noch unklar, allein durch die mit der Nahrung aufgenommenen Stoffe können eine Vielzahl von Formen induziert werden (19), wobei die menschlichen von den tierischen Formen grundsätzlich wieder verschieden sind (46).

Besonders auch bei Hemmstudien mit dem gleichen Substrat bei unterschiedlich vorbehandelten Ratten deutet das unterschiedliche Verhalten von Hemmstoffen auf verschiedene Formen von Cyt P-450 hin. Z.B. hemmt 7,8-Benzoflavon die Benzpyrenhydroxylation bei 3-Methylcholanthren behandelten Ratten, aber nicht bei Phenobarbital behandelten (46, 81). Weitere Bei-

spiele gibt es auch für Metyrapon, SKF 525A (46) und auch für Cimetidin. So hemmt Cimetidin in Lebermikrosomen die Aminopyrin-N-Demethylation von unbehandelten, Phenobarbital und 3-Methylcholanthren vorbehandelten Ratten mit einem K_i-Wert von 10 mM lautet Pelkonen (55), die Benzpyrenhydroxylation aber nur bei unbehandelten und Phenobarbital vorbehandelten Ratten mit einem K_i-Wert von 1 mM. Bei 3-Methylcholanthren vorbehandelten Ratten findet Pelkonen (55) keine Hemmung der Benzpyrenhydroxylase durch Cimetidin. Ebenso hemmt Cimetidin in Rattenmikrosomen aus Magenschleimhaut die 7-Äthoxycoumarin-O-Deäthylase geringer in 3-Methylcholanthren vorbehandelten (allerdings immer noch mit einem K_i-Wert von 1,25 mM) als in unbehandelten Ratten mit einem K_i-Wert von 0,64 mM (4). Es scheint also Cimetidin weniger die 3-Methylcholanthren induzierten Cyt P-448 abhängigen als vielmehr die Cyt P-450 abhängigen Reaktionen bei Phenobarbital bzw. keiner Vorbehandlung zu hemmen.

Die EOD-Reaktion wird bei der Ratte besonders durch Cyt P-448 katalysiert, da ihre spezifische Aktivität durch 3-Methylcholanthren rund 3mal stärker als mit Phenobarbital zu induzieren ist (81). Genauso verhält sich Cimetidin auch beim in vivo Atmungstest mit der Metabolisierung von Phenacetin, das als potentieller Indikator für Cyt P-448 gilt, und dessen Abbau durch Cimetidin nicht gehemmt wird (16). Gegen eine alleinige Bindung von Cimetidin an Cyt P-450, nicht dagegen an Cyt P-448, spricht, daß auch der Koffein-Metabolismus im in vivo Atmungstest von Cimetidin gehemmt wird, obwohl dieser als Indikator für Cyt P-448 gilt (16).

Im Gegenteil beschreibt Pelkonen bei Bindungsstudien von Rattenlebermikrosomen sogar ein höheres Bindungsspektrum von Cimetidin mit 3-Methylcholanthren-Mikrosomen als mit Phenobarbital-Mikrosomen (55), nicht dagegen bei Magenmikrosomen (4). Die Affinität von Cimetidin zu den Mikrosomen mit einem K_s-Wert von 0,1 mM differiert also von seinen Hemmeigenschaften mit K_i-Werten zwischen 1-10 mM (55). Eine ähnli-

che Abweichung fand auch Speeg mit dem Hemmstoff ICI 125, 211, der die Aminopyrin-N-Demethylation der Ratte in vitro schwächer hemmt als Cimetidin, jedoch bei der Bindungsstudie eine höhere Affinität zeigt (75). Daraus folgt, daß allein aus den spektralen Veränderungen nicht direkt auf die Hemmstärke geschlossen werden kann (55).

Neben Cyt P-448 und Cyt P-450 kommen beim Menschen eine Vielzahl unterschiedlicher Formen des Cyt P-450 vor. Man kann daher annehmen, daß bei Pat. I im Vergleich zu Pat. II und III ein anderes Isoenzym des Cyt P-450 mit der EOD-Reaktion erfaßt wurde, das durch Medikamenten- oder Nahrungsinduktion oder sonstige Faktoren eine andere Kinetik mit höherem K_m-Wert, d.h. niedrigerer Affinität, und höherem v_{max}, d.h. höherer Umsatzrate von 7-EC, zeigt.

Was die Hemmung mit Cimetidin und Ranitidin anbetrifft, liegen die $K_{i,cim}$-Werte der drei Patienten mit 2.49, 3.94 und 1.01 x 10^{-3} M alle in der gleichen Größenordnung, so daß die prozentuale Hemmung des Enzyms bei allen drei gleich ausgeprägt ist (Tab. 4), wobei eine 50 %-Hemmung der EOD ungefähr durch die mittlere Cimetidin-Konzentration von 1.5 mM bewirkt wird. Das stimmt auch mit Untersuchungen von Puurunen mit 50 %-Hemmung der menschlichen Benzpyrenhydroxylase durch 1mM Cimetidin überein (59), bzw. mit dem K_i-Wert von 1.26 mM bei der Meperidin-Demethylation des Menschen (39). Für die Aminopyrin-N-Demethylation sind bei Ratten K_i-Werte von Cimetidin von 1 mM (74) und 5-10 mM (58) beschrieben.
Die $K_{i,ran}$-Werte sind bei allen drei Patienten höher und zeigen damit auf molekularer Basis eine deutliche, aber geringere Hemmung der EOD als Cimetidin. Das Ausmaß der Hemmwirkung unterliegt individuellen Schwankungen. Bei Pat. II ist sie für Cimetidin und Ranitidin am schwächsten ausgeprägt.

Was hierbei noch auffällt, ist das relative Ausmaß der Hemmwirkungen von Cimetidin und Ranitidin bei den drei Patienten. So zeigen Pat. II und III eine rund 5fach stärkere Hemmwirkung von Cimetidin als von Ranitidin, während bei Pat. I

Cimetidin nur rund 1,5mal wirksamer als Ranitidin ist. Dies ließe sich wiederum damit erklären, daß bei Pat. I ein anderes Isoenzym vorliegt, das von den Hemmstoffen verschieden beeinflußt wird.

Ranitidin kann also beim Mensch in vitro die EOD hemmen und bei der Ratte die Aminopyrin-N-Demethylase (75). Dagegen wird beim Menschen auch in vitro, im Gegensatz zu Cimetidin, die Meperidindemethylase und die Pentobarbitalhydroxylase durch Ranitidin nicht beeinflußt (39). So zeigt Ranitidin in vitro nicht nur eine allgemein schwächere Hemmung als Cimetidin, es scheint auch ein anderes Isoenzym zu beinfflussen, das z.B. bei der Aminopyrin-N-Demethylase, nicht aber bei der Meperidindemethylase zum Einsatz kommt.

Das zeigt sich auch in der unterschiedlichen Art des Hemmtyps, der bei der Aminopyrin-N-Demethylation für Cimetidin als kompetitiv, für Ranitidin als 'mixed inhibition' (74) angesehen wird. Allerdings scheint diese Bestimmung nicht so eindeutig zu sein, da Speeg bei einer späteren Arbeit (75) bei der gleichen Reaktion auch Cimetidin als 'mixed inhibitor' ansieht, außerdem scheint nach Knodell (39) die Art des Hemmtyps, ob kompetitiv oder nicht kompetitiv, von der Konzentration des Hemmstoffs abzuhängen. Bei der vorliegenden Arbeit konnte weder Cimetidin noch Ranitidin einem eindeutigen Hemmtyp zugeordnet werden (s. 3.3.).

Vergleicht man nun die K_i-Werte von Cimetidin und Ranitidin mit der in vivo Konzentration, die bei therapeutischer Dosierung im menschlichen Blut erreicht werden, ergibt sich eine Diskrepanz (39). Der therapeutische Plasmaspiegel für Cimetidin wird mit 0,5-1,5 mg/l angegeben (83), was mit einem MG von 252 ungefähr 2-6 µM entspricht. Die K_i-Werte liegen aber mit 1-3 mM rund 3 Zehnerpotenzen höher. Der therapeutische Plasmaspiegel für Ranitidin liegt mit ungefähr 250 µg/l (54) noch niedriger, was mit einem MG von 351 ungefähr 0,7 µM entspricht. Bei Ranitidin ist also die in vivo Konzentration noch geringer, was die mangelnde Hemmwirkung

bei Mensch und Ratte in vivo erklären könnte. Für die Hemmwirkung von Cimetidin in vivo muß seine Konzentration am endoplasmatischen Retikulum der Leber aber um ein Vielfaches höher sein. Dafür spricht auch die gefundene 5fach höhere Konzentration in der Galle (38), die auf einen noch stärkeren Konzentrierungsvorgang in der Leber hinweist, ebenso die Effektivität von Cimetidin und Ranitidin auf die Magensäuresekretion, die die Plasmahalbwertszeit von zwei Stunden bei weitem übersteigt (1, 38). Der Hauptmetabolit von Cimetidin, das Cimetidinsulfoxid, kann für diese Diskrepanz auch nicht verantwortlich sein, da es sowieso nur zu 20 % entsteht und auch in vivo keine, in vitro nur eine sehr geringe Hemmwirkung zeigt (75). Das Cimetidinsulfoxid ist allerdings eventuell für neurologische und zerebrale Komplikationen bei Dialysepatienten verantwortlich (78).

Um über den Angriff des Hemmstoffs im Monooxygenasesystem, das ja aus mehreren Enzymen besteht (1.1.), mehr aussagen zu können, wurde der Einfluß der Hemmstoffe auf die NADPH-Cyt c-Reduktase untersucht. Die spezifische Reduktase-Aktivität bei Substratsättigung entspricht mit 144 nM/min/mg Prot dem angegebenen Wert von Knodell (39) mit 138 nM/min/mg Prot. Wie bei 1.2.2.2. beschrieben, kann eine Substanz mit hohem Oxidations-Reduktions-Potential die Elektronen der Cyt P-450-Reduktase abfangen und damit die Monooxygenasereaktion hemmen. Wie die Ergebnisse von 3.4. jedoch zeigen, beeinflußt Ranitidin selbst in Konzentrationen von 11.5 mM die Cyt c-Reduktase überhaupt nicht, die ja als das entsprechende in vitro Modell für die Cyt P-450-Reduktase gilt (s. 2.2.3.). Ebenso zeigt Cimetidin nur eine sehr geringe Beeinflussung der Reduktase, so daß der Hauptteil seiner Hemmwirkung auf anderen Hemmechanismen beruhen muß.

Darüber gibt nun das Bindungsspektrum etwas mehr Auskunft. Da Cimetidin ein eindeutiges Bindungsspektrum vom Typ II zeigt, was mit den Versuchen von Rendić (64) bei Phenobarbital vorbehandelten Ratten und mit Knodell (39) übereinstimmt, kann man nach 2.2.6. daraus schließen, daß Cimetidin

sich direkt ans Fe-Atom des Cyt P-450 auf der Seite vom Sauerstoff anlagert und von dort aus die Monooxygenasereaktion hemmt. Interessant wäre in diesem Zusammenhang auch der Versuch, ob Cimetidin tatsächlich durch seine Bindung am Fe-Atom CO aus dem Komplex mit Cyt P-450 verdrängen kann, was für die Substanzen des Typ II-Bindungsspektrums beschrieben wird (69), und was damit die Annahme der Bindung von Cimetidin an das Fe-Atom unterstützte.

Mit Hilfe der Hemmstoffe, ihres Bindungs- und Hemmtyps versucht man dem räumlichen Modell des Cyt P-450 näher zu kommen (50). So kann man auch Metyrapon als Modell für Cimetidin auffassen, da beide ein Typ II-Bindungsspektrum zeigen, Cyt P-448-Reaktionen weniger hemmen, kompetitiv Typ I-Substrate hemmen und selbst auch metabolisiert werden, was ja an der hydrophoben Seite, der Typ I-Seite, des Cyt P-450 stattfinden muß. Wie nun der Hemmstoff die Beziehung zu beiden Stellen des Cytochroms aufnimmt, ob er an beide gleichzeitig binden kann (Hypothese 67, 87), ein allosterischer Mechanismus vorhanden ist (50), ob es auf der Typ I-Seite verschiedene Stellen für verschiedene Substrate und damit verschiedene Hemmtypen mit dem gleichen Typ II-Hemmstoff gibt (50), oder ob letzteres durch den Metabolit-Cyt P-450-Oxygenkomplex verändert wird (50), ist alles noch unklar.

Auch muß eine Substanz mit einem Typ II-Spektrum, die selbst metabolisiert werden kann, aus einer Mischform bestehen, da die reine Typ II-Bindung den O_2 verdrängt und damit eine Substratumsetzung unmöglich macht. Die Tatsache, daß einige Hemmstoffe wie Propoxyphen und SKF 525A auch als Induktoren wirken können (s. 1.2.2.2.), trifft bei Cimetidin nicht zu (55), da es auch nicht die Menge an Cyt P-450 verändert. Dies spricht für einen Hemmechanismus auf der Ebene des Cyt P-450 Moleküls, unabhängig von genetischen Einflüssen. Cimetidin zeigt auch eine hohe Bindungsaffinität zu den Mikrosomen, ersichtlich in dem K_s-Wert von 31 µM (39), was aber nicht auf eine hohe Hemmwirkung schließen läßt (s.o.).

Bei Knodell (39) ergab sich mit Ranitidin in einer Konzentration von 0,28 mM und Rattenmikrosomen ein Nullinienspektrum, wogegen Speeg (75) auch für Ranitidin ein leicht abgeändertes Typ II-Bindungsspektrum mit Wellenberg bei 423 nm und Wellental bei 390 nm fand, allerdings konzentrationsabhängig nicht unter 0,5 mM, was bei Knodell ja der Fall war. Die K_s-Werte für Ranitidin und Cimetidinsulfoxid sind sehr hoch und zeigen so eine geringe Affinität zu Lebermikrosomen, was in diesem Fall mit der Hemmwirkung übereinstimmt. Bei Bindungsstudien mit menschlichen Lebermikrosomen in der vorliegenden Arbeit ergab sich mit Ranitidin in einer Konzentration von 23 mM kein eindeutiges Typ I, Typ II oder reverse Typ I-Verhalten, so daß man über die Bindungsstelle des Ranitidins nichts näheres aussagen kann.

Bisher haben wir den Fremdstoffmetabolismus und die Auswirkungen von Hemmstoffen nur bei gesunden Lebern von Mensch und Tier betrachtet. Tatsächlich werden die H_2-Rezeptorenblocker jedoch beim kranken Menschen angewendet, der durchaus auch einen Leberschaden haben kann. Z.B. zeigt sich bei Patienten mit einem Diabetes mellitus und daraus resultierender Fettleber, daß der Fremdstoffmetabolismus eingeschränkt ist, wogegen Diabetes an sich keine Veränderung bewirkt (66). Dabei treten aber große interindividuelle Unterschiede auf, was man wohl auch bei Pat. III mit Diabetes mellitus und schwerer Fettleber annehmen kann, der eine recht hohe spezifische EOD-Aktivität zeigt. Auch bei alkoholischem Leberschaden kann sich der Fremdstoffmetabolismus im Sinne einer Steigerung verändern, wo hingegen der alleinige Alkoholkonsum keine Veränderung bewirkt (31).

Auch das Ausmaß der Hemmwirkung von Stoffen wird durch den Grad der Leberschädigung bestimmt. So wurde bei Mäusen experimentell mit Acetaminophen ein Leberschaden provoziert, und es zeigte sich anschließend eine weitaus höhere Hemmwirkung von Cimetidin auf den Aminopyrin-Metabolismus (75). Auch beim Menschen wurde bereits untersucht, daß die Leber-

mikrosomenfunktion, die durch eine chronische Lebererkrankung auf rund die Hälfte absinkt, bei Cimetidinbehandlung prozentual viel stärker, um weitere 50 %, im Gegensatz zu 25 % Hemmung bei normaler Leberfunktion, abnimmt (65). Dies zeigt also, daß das Risiko der Nebenwirkung von Hemmstoffen, im speziellen die Interaktion von H_2-Rezeptorenblocker mit anderen Medikamenten, bei Patienten mit gestörter Leberfunktion weitaus stärker ist und die Medikamentenspiegel bei diesen Patienten noch sehr viel genauer überwacht werden müssen.

Besonders in diesem Zusammenhang muß noch weiter untersucht werden, ob die in vitro festgestellte Hemmwirkung von Ranitidin, die sich seither beim Menschen in vivo mit Antipyrin, Aminopyrin und Warfarin nicht bestätigen ließ, auch bei verminderter Leberfunktion nicht durchschlägt. Damit wäre Ranitidin als H_2-Rezeptorenblocker sicher zu bevorzugen, wenn beim Patienten ein zusätzlicher Leberschaden vorliegt, er zusätzlich Medikamente einnimmt, renale Komplikationen vorliegen (78), oder er allgemein Cimetidin resistent ist (42).

Andererseits ist Cimetidin, ein billigeres Medikament, auch schon 4 Jahre länger erprobt. Neuerdings macht Cimetidin auch noch auf dem Gebiet der Tumorforschung von sich reden. Es wird hart diskutiert, ob sich mit Cimetidin durch die Verminderung der Magensäure die nitratreduzierenden Bakterien vermehren und so aus Nahrungs-Nitrat die karzinogenen Nitrosamine bilden können, bzw. ob Cimetidin in ein Nitrosoderivat abgebaut werden kann (7, 42, 60).

Unabhängig von diesem Streit könnte Cimetidin im Gegenteil sogar therapeutisch bei Tumorpatienten eingesetzt werden. Es wurde zum einen schon gezeigt, daß Cimetidin durch seinen Eingriff ins Immunsystem mit Inaktivierung von T-Suppressorzellen, die H_2-Rezeptoren an der Oberfläche besitzen, die natürliche Antikörperbildung des Körpers gegen die Tumor-Antigene unterstützt und damit tatsächlich die Metastasenrate gesenkt und die Überlebensrate von Tumor-Mäusen gesteigert hat (52).

Zum andern könnte Cimetidin aber eben durch oben gezeigten starken Hemmeffekt der Biotransformationsenzyme die Entstehung von einigen Karzinogenen verhindern. Wie bei 1.1. bereits beschrieben, können durch das Cyt P-450-Biotransformationssystem Substanzen auch erst gegiftet werden, wozu auch Umweltstoffe wie polycyclische aromatische Hydrocarbone, Aflatoxine, Nitrosamine (34) und auch das anorganische Chromat (23) gehören. Diese Stoffe werden durch Reduktion, Oxidation usw. erst zu den eigentlichen zellschädigenden Karzinogenen metabolisiert. Stark hemmende Substanzen wie Cimetidin könnten dies verhindern und hätten damit eine schützende Rolle vor Aktivierung von Präkarzinogenen (4). Kapitulnik sucht für diese Giftungs-Enzyme andere sichere Substanzen, die den gleichen Metabolismus wie die toxische Substanz durchlaufen, und deren Umsatz eine Screening-Methode für eine mögliche Gefährdung dieses Patienten für ein Karzinom wäre (34). So fand er z.B. bei Zigarettenraucher mit Lungen-Karzinom eine höhere Benzpyrenhydroxylaseaktivität, aus der eventuell eine höhere Karzinomanfälligkeit dieser Patienten resultieren kann (34).

Weiterhin kann Cimetidin durch seine Hemmwirkung die Wirkung von Cyclophosphamid auf die Leukämie bei Mäusen verstärken und zeigt eine Steigerung der mittleren Überlebensdauer (18). Dies beruht auf einer Erhöhung des Plasmaspiegels des eigentlich wirksamen Metabolits von Cyclophosphamids, wodurch man in der Therapie der Tumoren auch Cytostatika einsparen könnte.

Nicht nur vor zu metabolisierenden Karzinogenen, sondern auch vor anderen Substanzen, deren Metabolit toxisch wirkt, bietet Cimetidin einen wirksamen Schutz. So kann die Lebernekrose durch den Metabolit von Acetaminophen (= Paracetamol) mit einer Cimetidin-Gabe bis zu 4 Stunden nach der Acetaminophengabe noch verhindert werden (48). Diese neue therapeutische Anwendung von Enzymhemmern, eventuell auch bei Vergiftungen mit CCl_4 oder Methanol, eröffnet für Cimetidin, als wohl sonst harmlosesten Hemmstoff im Gegensatz zu Metyrapon etc.,

einen ganz neuen Indikationsbereich, der die anfängliche Neben- in eine nützliche Hauptwirkung umwandelt.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Durch das sich immer mehr ausbreitende therapeutische Einsatzgebiet von H_2-Rezeptorenblocker gewinnen die Nebenwirkungen dieser Substanzen zunehmend an Bedeutung und werden entscheidend für die Auswahl zwischen diesen Substanzen.

So wird in der vorliegenden Arbeit die Hemmwirkung von Cimetidin und Ranitidin auf menschliche Lebermikrosomen in vitro getestet. Als Modellenzym für die Arzneimittel- und Fremdstoff-metabolisierenden Biotransformationsenzyme gelten die Monooxygenase 7-Äthoxycoumarin-O-Deäthylase und die NADPH-Cytochrom c-Reduktase.

Es zeigt sich folgendes:

- Die EOD-Aktivität in fertig präparierten menschlichen Lebermikrosomen nimmt mit der Zeit nach Mikrosomenfertigstellung kontinuierlich ab; nach 9 Stunden besteht ein mittlerer Aktivitätsverlust von 44 %.
- Die drei Patienten besitzen eine spezifische 7-Äthoxycoumarin-O-Deäthylase-Aktivität zwischen 300 und 610 pM min mg Prot.
- Die K_m-Werte liegen für Pat. II und III bei 4.1 und 4.2×10^{-5} M. Die v_{max}-Werte betragen 0.39 und 0.54 nM min mg Prot. Nur Pat. I weicht davon etwas ab, mit einem K_m-Wert von 4.8×10^{-4} M und einem v_{max}-Wert von 1.5 nM min mg Prot. Dies läßt auf ein anderes Isoenzym schließen, das eventuell auch durch Medikamente induziert ist.
- Die $K_{i,cim}$-Werte aller drei Patienten liegen mit 2.49, 3.94 und 1.01×10^{-3} M in der gleichen Größenordnung und zeigen eine deutliche Hemmwirkung von Cimetidin auf die 7-Äthoxycoumarin-O-Deäthylase.
- Ranitidin hemmt ebenfalls die 7-Äthoxycoumarin-O-Deäthylase, jedoch bei Pat. II und III mit nur 1/5, bei Pat. I und dem veränderten Isoenzym mit 2/3 der Hemmstärke von Cimetidin.

- Die NADPH-Cytochrom c-Reduktase wird weder durch Cimetidin noch durch Ranitidin beeinflußt.
- Das Bindungsspektrum für Cimetidin ergibt einen eindeutigen Typ II; für Ranitidin ist kein klarer Bindungstyp zuzuordnen.

Folgende Schlußfolgerungen können gezogen werden:

1) Cimetidin vermindert den oxidativen Arzneimittelmetabolismus der menschlichen Leber durch eine Hemmung der arzneimittelabbauenden Enzyme.

2) Ranitidin zeigt einen enzymatischen Hemmeffekt bei sehr viel höheren Konzentrationen, die im Körper wahrscheinlich nicht erreicht werden.

3) Aufgrund des Typ II Bindungsspektrums und der mangelnden Hemmung der NADPH-Cytochrom c-Reduktase ergibt sich für Cimetidin ein direkter Angriff am Fe-Atom des Cyt P-450 auf der Seite des Sauerstoffs und von dort aus eine hemmende Wirkung auf die anders lokalisierte Substratumsetzungsstelle.

4) Die Hemmwirkung der H_2-Rezeptoren-Blocker betrifft nur bestimmte Isoenzyme des oxidativen Fremdstoffmetabolismus in unterschiedlicher Ausprägung.

5) Ranitidin sollte als wirksamer H_2-Rezeptorenblocker bei Cimetidinresistenz, bei vorliegendem Leberschaden, bei renalen Komplikationen, bei älteren Patienten und bei zusätzlich eingenommenen Medikamenten bevorzugt werden.

6) Cimetidin könnte darüberhinaus durch eine starke Hemmwirkung als Schutzfaktor vor Aktivierung von Präkarzinogenen, zur Einsparung von Cytostatica und bei Vergiftungen mit Substanzen, deren Metabolite toxisch sind, eingesetzt werden.

6. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1) BERSTAD, A., FRISLID, K., RYDNING, A.:
Relationship between ranitidine plasma levels and reduction of postprandial intragastric acidity in healthy man.
In: Scand J of Gastroent 17 (1), 109-112 (1982)

2) BICKEL, M. H.:
Tissue bindings of drugs.
In: Acta pharm. Suecica 17, 73 (1980)

3) BISSWANGER, H.:
Theorie und Methoden der Enzymkinetik. Eine Einführung für Biochemiker, Biologen und Mediziner. Weinheim, Deerfield Beach (Florida), Basel: Verlag Chemie 1979,
S. 55-103, 125-131, 152-168, 177-183

4) BORM, P., BAST, A., SIEREVOGEL, A., NOORDHOEK, J.:
Cytochrome P-450 and ethoxycoumarindeethylation in rat gastric microsomes: induction by 3-methylcholanthrene and inhibition by cimetidine.
In: Biochem Biophys Res Commun 102 (2), 784-90 (1981)

5) BORN, J. L., HADLEY, W. M.:
Inhibition of in vitro cytochrome P-450 - catalyzed reactions by substituted pyridines.
In: J. of pharmaceutical Sciences 69 (4), 465 (1980)

6) BORN, J. L., HADLEY, W. M.:
Ligand interactions of 4-pyridylethers with cytochrome P-450.
In: Proc. West. Pharmacol. Soc. 23, 259 (1980)

7) BRIMBLECOMBE, R. W.:
Cimetidine, Nitrosation, and Carcinogenicity.
In: Lancet Febr., 402 (1982)

8) BRIMBLECOMBE, R. W., DUNCAN, W. A. M., DURANT, G. J., EMMETT, J. C., GANELLIN, C. R., PARSONS, M. E.:
Cimetidine - a non-thiourea H_2-receptor antagonist.
In: J. Int. Med. Res. 3, 86-92 (1975)

9) BRIMBLECOMBE, R. W., DUNCAN, W. A. M., DURANT, G. J., GANELLIN, C. R., PARSONS, M. E., BLACK, J. W.:
The pharmacology of cimetidine, a new histamine H_2-receptor antagonist.
In: Brit. J. Pharm., Proceedings of the B.P.S., 8.-10.1.1975, 435 (1975)

10) BRODIE, B. B., GILETTE, J. R., LA DU, B. N.:
In: Ann. Rev. Biochem. 27, 427 (1958)

11) BUDDECKE, E.:
Grundriß der Biochemie. Für Studierende der Medizin, Zahnmedizin und Naturwissenschaften. 6., neubearb. Aufl. Berlin, New York: Walter de Gruyter 1980, S. 14-34, 277-279, 425-426, 458-461

12) BURLAND, W. L., DUNCAN, W. A. M., HESSELBO, T., MILLS, J. G., SHARPE, P. C., HAGGIE, S. J., WYLLIE, J. H.:
Pharmacological evaluation of cimetidine, a new histamine H_2-receptor antagonist, in healthy man.
In: Br. J. Clin. Pharm. 2, 481-486 (1975)

13) CARGILL, J. M., PEDEN, N., SAUNDERS, J. H. B., WORMSLEY, K. G.:
Very long-term treatment of peptic ulcer with cimetidine.
In: Lancet, ii, 1113-1115 (1978)

14) CREUTZFELDT, W., ARNOLD, R.: (Hrsg.)
Cimetidin. Verhandlungsberichte des Internat. Symposiums über Histamin-H_2-Rezeptor Antagonisten. 10.-11. Nov. 1977 Göttingen. Amsterdam, Oxford: Excerpta Medica 1978

Lorenz, W., S. 6ff.; Parsons, M. E., S. 41ff.; Aadland, E., S. 52ff.; Burland, W. L., S. 81ff.; Rowley-Jones, D., S. 87ff.; Arnold, Creutzfeldt, S. 97ff.; Stag, J. G., S. 151ff.; Peter et al., S. 207ff.; Wulff, S. 237ff.; Burland, W. L., S. 261ff.; Lepsien, G., S. 285ff.; Pykes, P. W., S. 298ff.

15) DALY, M. J., STABLES, R.:
In vitro actions of ranitidine, a new histamine H_2-receptor antagonist.
In: Agents and actions 10, 190f. (1980)

16) DESMOND, P., PATWARDHAN, R., PARKER, R., SCHENKER, S., SPEEG, K. V.:
Effect of cimetidine and other antihistaminics on the elimination of aminopyrin, phenacetin and caffeine.
In: Life Sci 26, 1261-1268 (1980)

17) DOMSCHKE, W., LUX, G., DOMSCHKE, S.:
Gastric inhibitory action of H_2-antagonists ranitidine and cimetidine.
In: Lancet, i, 320 (1979)

18) DORR, R. T., ALBERTS, D. S.:
Cimetidine - Enhancement of cyclophosphamid antitumour activity.
In: Brit. J. Cancer 45, 35 (1982)

19) ESTABROOK, R., WATERMAN, M., DU BOIS, R., SIMPSON, E., WERRINGLOER, J.:
The induction of cytochromes P-450 related to drug, steroid and carcinogen metabolism.
In: Molecular basis of drug action (Singer, T., Ondarza, R., eds.)
Elsevier North Holland Press 1981, S. 361-386

20) FEELY, J., WILKINSON, G., WOOD, A.:
Reduction of liver blood flow and propranolol metabolism by cimetidine.
In: N Engl J Med 304 (12), 692-5 (1981)

21) FINE, ., CHURCHILL, .:
Potentially lethal interaction of cimetidine and morphine.
In: Can Med Assoc J 124, 1434-1436 (1981)

22) FORTH, W., HENSCHLER, D., RUMMEL, W.:
Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie.
3. überarb. u. erw. Aufl. - Mannheim, Wien, Zürich: Bibliographisches Institut 1980, S. 39-49, 146-149

23) GARCIA, J. D., JENNETTE, K.:
Electron-transport cytochrome P-450 system is involved in the microsomal metabolism of the carcinogen chromate.
In: J Inorg Biochem 14 (4), 281-95 (1981)

24) GLAXO Pharmazeutika GmbH:
Ranitidin in Anästhesie und Intensivmedizin.
In: Gastroenterologische Praxis 1, 6 (1982)

25) GRAINGER, S., MARIGOLD, J., KEELING, P.:
Ranitidine and liver blood flow.
In: Lancet Febr., 398 (1982)

26) HARRIS, A., COOK, P., JEWELL, D., JANES, I.:
Cimetidine and cerebral blood flow in elderly patients.
In: Br. J. clin. Pharm. 11, 93-94 (1981)

27) HENRY, D. A., MACDONALD, I. A., KITCHINGMAN, G., BELL, G. D., LANGMAN, M. J. S.:
Cimetidine and ranitidine: comparison of effects on hepatic drug metabolism.
In: Brit. Med. J. 281, 775-777 (1980)

28) HETZEL, D., BIRKETT, D., MINERS, J.:
Cimetidine interaction with warfarin.
In: Lancet, Sept., 639 (1979)

29) HOENSCH, H.:
Habilitationsarbeit der Med. Fakultät der Eberhard-Karls-Universität Tübingen: 1979, S. 56-58, 92-97; Abb. 29, 37, 39, 40, 43

30) HOENSCH, H., FLEISCHMANN, R.:
Chemische Karzinogenese im Gastrointestinaltrakt.
In: Dtsch. med. Wschr. 102, 1516-1520 (1977)

31) HOENSCH, H., HARTMANN, F., SCHOMERUS, H., BIECK, P., DÖLLE, W.:
Monooxygenase enzyme activity in alcoholics with varying degrees of liver damage.
In: Gut 20, 666-672 (1979)

32) JACKSON, J. E.:
Reduction of liver blood flow by cimetidine.
In: N Engl J Med 305 (2), 99-101 (1981)

33) JACOBSEN, M., LEVIN, W., POPPERS, P. J., WOOD, A. W., CONNEY, A. H.:
Comparison of the O-dealkylation of 7-ethoxycoumarin and the hydroxylation of benzo(a)pyrene in human placenta.
In: Clin. Pharm. and Therap. 16, 701-710 (1974)

34) KAPITULNIK, J., POPPERS, P., CONNEY, A. H.:
Comparative metabolism of benzopyrene and drugs in human liver.
In: Clin. Pharmacol. Ther. 21, 166-176 (1977)

35) KLOTZ, U., MÜLLER-SEYDLITZ, P.:
Altered elimination of desmethyldiazepam in the elderly.
In: Br. J. Clin. Pharm. 7, 119-120 (1979)

36) KLOTZ, U., ANTILLA, V.-J., REIMANN, I.:
Cimetidine/Diazepam interaction.
In: Lancet Sept., 699 (1979)

37) KLOTZ, U., REIMANN, I.:
Delayed clearance of diazepam due to cimetidine.
In: N Engl J Med 302, 1012-1014 (1980)

38) KLOTZ, U., REIMANN, I.:
Influence of cimetidine on the pharmacokinetics of desmethyldiazepam and oxazepam.
In: Eur. J. Clin. Pharm. 18, 517-520 (1980)

39) KNODELL, R. G., HOLTZMAN, J. L., CRANKSHAW, D. L., STEELE, N. M., STANLEY, L. N.:
Drug metabolism by rat and human hepatic microsomes in response to interaction with H_2-receptor antagonists
In: Gastroenterol 82, 84-88 (1982)

40) KUSCHINSKY, G., LÜLLMANN, H.:
Kurzes Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie.
8. überarb. u. erw. Aufl., Stuttgart: Thieme 1978,
S. 20-21, 94-98

41) Lancet, ii, 1237 (1978) (ed.)

42) Lancet März, 601 (1982) (ed.): Cimetidine and ranitidine.

43) LANGMAN, M. J. S., HENRY, D. A., BELL, G. D., BURNHAM, W. R., OGILVY, A.:
Cimetidine and ranitidine in duodenal ulcer.
In: Brit. Med. J. 281, 473-474 (1980)

44) LÖFFLER, A.:
Ranitidin und Cimetidin.
In: Dtsch. med. Wschr. 106, 382 (1981)

45) LOWRY, O. H., ROSENBROUGH, N. J., FARR, A. L., RANDALL, R. J.:
Protein measurement with the folin phenol reagent.
In: J. biol. Chem. 193, 265-275 (1951)

46) LU, A. Y. H., WEST, S. B.:
Multiplicity of mammalian microsomal cytochromes P-450.
In: Pharmacol. Rev. 31 (4), 277-95 (1979)

47) MEHNERT, H., FÖRSTER, H.:
Stoffwechselkrankheiten. Biochemie und Klinik.
Stuttgart: Thieme 1975, S. 1-20

48) MITCHELL, M., SCHENKER, S., AVANT, G., SPEEG, K. V.:
Cimetidine protects against acetaminophen hepatotoxicity in rats.
In: Gastroenterol 81, 1052-60 (1981)

49) MUTSCHLER, E.:
Arzneimittelwirkungen. Ein Lehrbuch der Pharmakologie für Pharmazeuten, Chemiker und Biologen. - 4. Aufl. - Stuttgart: Wissenschaftl. Verlagsgesellschaft 1981, S. 18-31

50) NETTER, K. J.:
Inhibition of oxidative drug metabolism in microsomes.
In: Pharmac. Ther. 10, 515-535 (1980)

51) NETTER, K. J., SEIDEL, G.:
An adaptively stimulated O-demethylating system in rat liver microsomes and its kinetic properties.
In: J. Pharm. exp. Therap. 146, 61 (1964)

52) OSBAND, M., SHEN, Y., SCHLESINGER, M., BROWN, A., HAMILTON, D., COHEN, E., LAVIN, P., MC CAFFREY, R.:
Successful tumour immunotherapy with cimetidine in mice.
In: Lancet März, 636-638 (1981)

53) PEDEN, N. R., SAUNDERS, J. H. B., WORMSLEY, K. G.:
Inhibition of pentagastrin-stimulated and nocturnal gastric secretion by ranitidine: a new H_2-receptor antagonist.
In: Lancet, i, 690-692 (1979)

54) PEDEN, N. R., RICHARDS, D. A., SAUNDERS, J. H. B., WORMSLEY, K. G.:
Pharmacologically effective plasma concentrations of ranitidine.
In: Lancet, ii, 199 (1979)

55) PELKONEN, O., PUURUNEN, J.:
The effect of cimetidine on in vitro and in vivo microsomal drug metabolism in the rat.
In: Biochem. Pharm. 29, 3075-3080 (1980)

56) PETERSON, G. R., HOSTETLER, R. M., LEHMAN, Th., COVAULT, H. P.:
Acute inhibition of oxidative drug metabolism by propoxyphene (Darvon).
In: Biochem. Pharm. 28, 1783-1789 (1979)

57) Physiologisch-Chemisches Praktikum für Mediziner und Naturwissenschaftler. - 8. Aufl. -, Physiol.-chem. Inst. d. Univ. Tübingen 1976

58) PUURUNEN, J., PELKONEN, O.:
Cimetidine inhibits microsomal drug metabolics in the rat.
In: Eur. J. Pharm. 55 , 335-336 (1979)

59) PUURUNEN, J., SCOTANIEMI, E., PELKONEN, O.:
Cimetidine inhibits microsomal drug metabolism in man.
In: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharm. 308, R24 (1979)

60) REED, P. I., HAINES, K., WALTERS, C. L., SMITH, S. L. R.:
Cimetidin - Nitrosation und Carinogenicity.
In: Lancet, ii, 1281 (1981)

61) REILLY, P. E. B., IVEY, D. E.:
Inhibition by chloramphenicol of the microsomal monooxygenase complex of rat liver.
In: FEBS Letters 97 (1) (1979)

62) REMMER, H.:
Die Induktion arzneimittelabbauender Enzyme im endoplasmatischen Retikulum der Leberzelle durch Pharmaka.
In: Dtsch. med.Wschr. 92, 2001-2008 (1967)

63) REMMER, H., SCHENKMAN, J. B., ESTABROOK, R., SASAME, H., GILETTE, J., NARASIMHULU, S., COOPER, D. Y., ROSENTHAL, O.:
Drug interaction with hepatic microsomal cytochrome.
In: Molec. Pharm. 2, 187 (1966)

64) RENDIĆ S., SUNJĆ, V., TOSO, R., KAJFEZ, F., RUF, H.-H.:
Interaction of cimetidine with liver microsomes.
In: Xenobiotica 9 (9), 555-564 (1979)

65) RÖLLINGHOFF, W., STICKEN, R., PAUMGARTNER, G.:
Inhibition of drug metabolism by cimetidine in man.
Dependence on pretreatment microsomal liver function.
In: Gastroenterol 80 (5), 1347 (1981)

66) SALMELA, P., SOTANIEMI, A., PELKONEN, R.:
The evaluation of the drug-metabolizing capacity in patients with diabetes mellitus.
In: Diabetes 29, 788-794 (1980)

67) SCHENKMAN, J. B.:
Effect of substrates on hepatic microsomal cytochrome P-450.
In: Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 349, 1624-1628 (1968)

68) SCHENKMAN, J. B., CINTI, D. L., MOLDEUS, P. W., ORRENIUS, S.:
Newer aspects of substrate binding to cytochrome P-450.
In: Drug Metab. Dispos. 1, 111-120 (1973)

69) SCHENKMAN, J. B., REMMER, H., ESTABROOK, R. W.:
Spectral studies of drug interaction with hepatic microsomal cytochrome.
In: Molec. Pharm. 3, 113 (1967)

70) SERLIN, M. J., SIBEON, R. G., MOSSMAN, S., BRECKENRIDGE, A. M., WILLIAMS, J. R. B., ATWOOD, J. L., WILLOUGHBY, J. M. T.:
Cimetidine: Interaction with oral anticoagulants in man.
In: Lancet Aug., 317-319 (1979)

71) SERLIN, M., SIBEON, R., BRECKENRIDGE, A. M.:
Lack of effect of ranitidine on warfarin action.
In: Br. J. clin. Pharm. 12, 791-794 (1981)

72) SIMON, B., DAMMANN, H. G., MÜLLER, P., KATHER, H. :
Ranitidin, ein neu entwickelter Histamin H_2-Rezeptor Antagonist. Erste experimentelle und klinische Daten.
In: Dtsch. med. Wschr. 105, 1753-1755 (1980)

73) SIMON, B., DAMMANN, H. G., MÜLLER, P., KATHER, H.:
Nebenwirkungen einer Cimetidin-Therapie: H_2-Rezeptor vermittelt oder unspezifischer Moleküleffekt?
In: Dtsch. med. Wschr. 105, 1756f (1980)

74) SPEEG, K. V., PATWARDHAN, R., AVANT, G. R., SCHENKER, S.:
Inhibition of microsomal drug elimination by histamine H_2-receptor antagonists.
In: Gastroenterol 79 (5 Part 2), 1055 (1980)

75) SPEEG, K. V., PATWARDHAN, R. V., AVANT, G. R., MITCHELL, M. C., SCHENKER, S.:
Inhibition of microsomal drug metabolism by histamine H_2-receptor antagonists studied in vivo and in vitro in rodents.
In: Gastroenterol 82, 89-96 (1982)

76) STAIGER, C., SIMON, B., WALTER, E., KATHER, H.:
Influence of ranitidine on antipyrine pharmacokinetics in healthy volunteers.
In: Dig. Diseas. a. Sciences 25 (11), 894 (1980)

77) TODHUNTER, J. A.:
Reversible enzyme inhibition.
In: Meth. in Enzym. 63, 383-411 (1979)

78) TOTTE, J., SCHARPE, S., VERKERK, R., NEELS, H., VAN-HAEVERBEEK, R., SMITZ, S., ROUSSEAU, J. J.:
Neurological dysfunction associated with abnormal levels of cimetidine metabolite.
In: Lancet Mai, 1047 (1981)

79) ULLRICH, V.:
On the hydroxylation of cyclohexane in rat liver microsomes.
In: Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 350, 357-365 (1969)

80) ULLRICH, V., WEBER, P.:
The O-dealkylation of 7-ethoxycoumarin by liver microsomes.
In: Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 353, 1171-1177 (1972)

81) ULLRICH, V., FROMMER, U., WEBER, P.:
Differences in the O-dealkylation of 7-ethoxycoumarin after petreatment with phenobarbital and 3-methylcholanthrene.
In: Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 354, 514-520 (1973)

82) UNSELD, D. W.:
Medizinisches Wörterbuch der deutschen und englischen Sprache. Medical dictionary of the english and german languages. - 7. Aufl. - Stuttgart: Wissenschaftl. Verlagsgesellschaft 1978

83) WALKENSTEIN, S., DUBB, J., RANDOLPH, W. WESTLAKE, W., STOTE, R., INTOCCIA, A.:
Bioavailability of cimetidine in man.
In: Gastroenterol 74, 360-365 (1978)

84) WALT, R. P., MALE, P. J., RAWLINGS, J., HUNT, R. H., MILTON-THOMPSON, G. J., MISIEWICZ, J. J.:
Comparison of the effects of ranitidine, cimetidine and placebo on the 24 hour intragastric acidity and nocturnal acid secretion in patients with duodenal ulcer.
In: Gut 22, 49-54 (1981)

85) WALT, R. P., TROTMAN, I. F., FROST, R., GOLDING, P. L., SHEPHERD, T. H., RAWLINGS, J., HUNT, R. H., COLIN-JONES, D., MILTON-THOMPSON, G. J., MISIEWICZ, J. J.:
Comparison of twice-daily ranitidine with standard cimetidine treatment of duodenal ulcer.
In: Gut 22, 319-322 (1981)

86) WEINBERGER, M., SMITH, G., MILAVEK, G., HENDELES, L.:
Decreased theophylline clearance due to cimetidine.
In: N Engl J Med 304, 672 (1981)

87) WILKINSON, C. F., HETNARSKI, K., HICKS, L. J.:
Substituted imidazoles as inhibitors of microsomal oxidation and insecticide synergists.
In: Pest. Biochem. Physio. 4, 299-312 (1974)

88) WILKINSON, G. N.:
Statistical estimations in enzyme kinetics.
In: Biochem. J. 80, 324-332 (1961)

89) WILLIAMS, Ch. H., Kamin, H.:
Microsomal triphosphopyridine nucleotide-cytochrome c-reductase of liver.
In: J of biol. chem. 237 (2), 587-594 (1962)

90) WOLFF, M. E.:
Burger's Medicinal Chemistry.
Part I: The basis of medicinal chemistry. - 5. Aufl. - New York, Chichester, Brisbane, Toronto:
John Wiley & Sons 1979, S. 107-119, 228-232.

Herrn Priv.-Doz. Dr. med. habil. H. P. Hoensch danke ich für das Thema dieser Arbeit und der regen Anteilnahme mit Ratschlägen während der ganzen Zeit ihrer Entstehung. Frl. Doris Maier verdanke ich die Einführung in die Methoden der Enzymforschung und häufige Mikrosomenpräparationen, Frl. Anne Maier die Gewinnung der Rattenleber, und ihnen allen mit Herrn Dr. André eine anregende Gesprächsbereitschaft.
Nicht zuletzt danke ich jedoch Herrn Dr. H. A. Besswanger für praktische Hinweise bei der Erstellung einer Enzymkinetik und der Diskussion meiner Ergebnisse.

Lebenslauf

Am 16. Februar 1959 wurde ich, Heike Hutzel, als Tochter des Landmaschinenkaufmanns Wilhelm Hutzel und der Gudrun Hutzel, geborene Schleehauf in Stuttgart-Sonnenberg geboren.

In den Jahren 1965 bis 1968 besuchte ich die Grundschule und von 1968 bis 1977 das Königin-Charlotte-Gymnasium, beidesmal in Stuttgart-Möhringen.

Nach Erwerb der allgemeinen Hochschulreife am 3. Mai 1977 begann ich das Studium der Medizin im WS 1977/78 an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen. Es folgten im SS 1979 die ärztliche Vorprüfung, im SS 1980 der erste Abschnitt der ärztlichen Prüfung, sowie im WS 1982/83 der zweite Abschnitt der ärztlichen Prüfung.

Nach Durchlaufen des Praktischen Jahres im Kreiskrankenhaus Reutlingen vom 18.4.1983 bis 19.3.1984 legte ich am 12.4.1984 erfolgreich den dritten Abschnitt der ärztlichen Prüfung ab.